

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Leukozide Substanzen von Staphylokokken

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Klaus Wenk
Tierarzt aus Ebenrode/Ostpr.

Gießen 1969

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Leukozide Substanzen von Staphylokokken

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Klaus Wenk

Tierarzt aus Ebenrode/Ostpr.

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: **Professor Dr. H. Tillmann**

Berichterstatter: **Professor Dr. H. Blobel**

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1969



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1,0 Einleitung	1
2,0 Literaturübersicht	3
2,1 Entdeckung verschiedener leukozider Substanzen bei Staphylokokken	3
2,2 Vorkommen leukozider Substanzen bei Staphylokokken	5
2,3 Nachweis des leukoziden Effektes bei Staphylokokken	10
2,4 Herstellung von Staphylokokkentoxinen mit leukozider Wirkung	13
2,5 Reindarstellung leukozider Substanzen von Staphylokokken	16
2,6 Zellschädigende Effekte der leukoziden Substanzen	18
3,0 Material und Methoden	25
3,1 Material	25
3,11 Staphylokokkenkulturen	25
3,12 Myxamöben	25
3,13 Nährsubstrat für Myxamöben	25
3,14 Nährmedien	26
3,15 Blut zur Isolierung von Leukozyten	29
3,16 Physiologische Puffermedien	30
3,17 PV-Leukozidin	32
3,18 NW-Leukozidin	32
3,19 Leukolysin	32

	Seite
3,2 Methoden	34
3,21 Isolierung lebender Granulozyten	34
3,22 Isolierung lebender Makrophagen	38
3,23 Kultivierung von Myxamöben	39
3,24 Kultivierung von Staphylokokken zur Leukozidinproduktion	40
3,25 Konzentrierung von PV-Leukozidin	41
3,26 Nachweis des leukoziden Effektes	41
3,261 Direkte mikroskopische Methode	41
3,262 Indirekte Farbindikatormethode	42
3,263 Nachweis von PV-Leukozidin	44
3,264 Nachweis von NW-Leukozidin	44
3,265 Nachweis von Leukolysin	44
3,266 Bestimmung der Minimalen Leukozi- den Dosis (MLeD)	45
3,27 Nachweis der Hämolysine	45
3,271 Auf festem Medium	45
3,272 In flüssigem Medium	46
3,273 Bestimmung der Minimalen Hämoly- tischen Dosis (MHD)	47
3,28 Nachweis von Koagulase	47
3,29 Nachweis der Mannitvergärung	48
4,0 Ergebnisse	49
4,1 Wahl der geeignetsten Methode zum Nach- weis des leukoziden Effektes	49
4,2 Ermittlung einiger Kulturbedingungen zur Erreichung eines optimalen Leukozi- dintiters in Staphylokokkenkulturen	53
4,3 Versuche zur Verbesserung der Methode zum Nachweis des leukoziden Effektes	63
4,31 Myxamöben als Testzellen	63
4,32 Granulozyten verschiedener Tierarten als Testzellen	64

4,4	Häufigkeit der Leukozidinbildung bei Staphylokokken verschiedener Herkunft	77
4,5	Wirkung leukozider Substanzen von Staphylokokkenkulturen vom Menschen, Rind und Hund auf Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund	84
4,6	Hämolysinbildung bei leukozidin-positiven Staphylokokken	90
5,0	Diskussion	98
6,0	Zusammenfassung	106
7,0	Literaturverzeichnis	108
	Anhang (Abb. 1 - 3)	117

Lebenslauf

1,0 Einleitung

Staphylokokken sind ubiquitär verbreitet und verursachen häufig Infektionen bei Mensch und Tier. In der Humanmedizin sind solche Infektionen unter dem Begriff des "Hospitalismus" bekanntgeworden, während in der Veterinärmedizin hartnäckige Mastitiden bei Rindern häufig Staphylococcus aureus zu ihren Erregern zählen.

Staphylokokkeninfektionen stellen zur Zeit in der Medizin ein Problem besonderer Art dar, weil sie in vielen Fällen mit Antibiotika und modernen Chemotherapeutika nicht wirksam behandelt werden können. Man ist deshalb bemüht, die Staphylokokkeninfektionen mit Hilfe einer Vakzine zu bekämpfen. Die Entwicklung einer solchen Vakzine setzt die genaue Kenntnis der Pathogenitätsfaktoren der Staphylokokken voraus.

Seit der Entdeckung der Staphylokokken vor der Jahrhundertwende versuchte man, ihre Pathogenitätsfaktoren kennenzulernen. Eine ganze Reihe von Eigenschaften der Staphylokokken war mit ihrer Pathogenität in Zusammenhang gebracht worden, z.B. die Koagulasebildung, die Mannitvergärung, die Fibrinolysin-, Hämolysin- und Leukozidinbildung. Schon mit Bekanntwerden der Leukozidinbildung war dieser Eigenschaft besondere Aufmerksamkeit geschenkt worden (VAN DE VELDE³⁹ 1894). Man verwies dabei auf die Abwehrfunktion der Leukozyten, die im Verlaufe einer Staphylokokkeninfektion möglicherweise durch Leukozidin geschädigt werden.

digst werden könnte (DENYS und VAN DE VELDE⁸ 1895). Wohl wegen methodischer Schwierigkeiten ist die Erforschung des Leukozidins bis heute lückenhaft geblieben.

In neuerer Zeit haben erneut einige Forscher die Bedeutung des Leukozidins bei Staphylokokkeninfektionen des Menschen betont (VALENTINE³⁷ 1936, VALENTINE und BUTLER³⁸ 1939, JOHANOWSKY²⁰ 1957, SVETOVIDOVA und LOBANOVA³⁵ 1965).

Über die Rolle des Leukozidins bei Erkrankungen der Tiere ist bisher nichts bekanntgeworden. Diese Tatsache und die zunehmende Bedeutung der Staphylokokkenmastitis des Rindes in der Veterinärmedizin sowie die damit notwendig werdende Entwicklung einer Staphylokokken-Vakzine bestimmten das Ziel dieser Arbeit: Die nähere Untersuchung des Leukozidins und seine Bedeutung für tierische Infektionen.

2,0 Literaturübersicht

2,1 Entdeckung verschiedener leukozider Substanzen bei Staphylokokken

Bereits 1894 beschrieb VAN DE VELDE³⁹ Versuche mit Kaninchen, die einen leukoziden Effekt von Staphylokokken und deren Produkten deutlich machten: Er injizierte lebende virulente Staphylokokken in die Pleurahöhle von Kaninchen und untersuchte darauf in Zeitabständen die Veränderungen des Pleuraexsudates mikroskopisch. Dabei fand er, daß 6 bis 10 Stunden nach der Injektion alle Leukozyten aus dem Pleuraexsudat tot waren und neue lebende Leukozyten, dem Pleuraexsudat hinzugefügt, nach kurzer Zeit zugrunde gingen.

Mit einer Staphylokokkenbouillonkultur konnte der Autor den gleichen Effekt auf Kaninchenleukozyten erzielen. VAN DE VELDE³⁹ sah das vermutliche Staphylokokkenprodukt als Leukozytengift an und nannte es "substance leucocide" oder "leucocidine".

Die weitere Erforschung dieser leukoziden Substanz zielte zunächst darauf hin, eine Beziehung zu den übrigen damals bekannten Eigenschaften der Staphylokokken (hämolytischer, dermonekrotischer und letaler Effekt) herzustellen. Dabei ging es um die Frage, ob der leukozide Effekt einem einzigen Staphylokokkentoxin zuzuschreiben war, das sowohl leukozide als auch hämolytische, dermonekrotische und letale Eigenschaften besaß

(GROSS¹⁵ 1931), oder ob er Ausdruck einer selbständigen leukoziden Substanz neben einem hämolytischen, dermonekrotischen und letalen Staphylokokkenprodukt war (NEISSER und WECHSBERG²⁷ 1901, JULIANELLE²¹ 1922, TAMAKI³⁶ 1928, PARKER, WELD und GUNTHER³² 1931, PANTON, VALENTINE und DIX²⁹ 1931, PANTON und VALENTINE³⁰ 1932). Zur Klärung dieses Problems konnte VALENTINE³⁷ 1936 zeigen, daß Leukoizin und α -Hämolsin unterschiedliche Wirkungsspektren besaßen, beide aber leukozide Wirksamkeit entfalteten, wobei α -Hämolsin nur Granulozyten des Kaninchens zerstörte, Leukoizin darüber hinaus auch auf Granulozyten des Menschen wirksam war. Diese Befunde konnten von WRIGHT⁴⁹ 1936 bestätigt werden. Er prägte daraufhin die Begriffe "NEISSER-WECHSBERG-Leukoizin" für den leukoziden Effekt des α -Hämolsins und "PANTON-VALENTINE-Leukoizin" für die leukozide Wirkung auf menschliche Granulozyten.

Einen weiteren leukoziden Faktor unter den Staphylokokkenprodukten beschrieben zuerst JACKSON und LITTLE¹⁷ 1956: Das δ -Hämolsin. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ gaben 1957 dem leukoziden Effekt des δ -Hämolsins den Namen "Leukolysin", weil ihnen aufgefallen war, daß durch den Einfluß dieses Toxins die Granulozyten vollständig lysiert wurden. Es sind also bis heute 3 leukozide Substanzen bei Staphylokokken bekanntgeworden: Das PANTON-VALENTINE-Leukoizin (PV-Leukoizin), das NEISSER-WECHSBERG-Leukoizin (NW-Leukoizin) und das Leukolysin. Das NW-Leukoizin wird heute als identisch mit α -Hämolsin und das Leukolysin als identisch mit δ -Hämolsin angesehen.

2,2 Vorkommen leukozider Substanzen bei Staphylokokken

Die in der Literatur vorzufindenden Kenntnisse über das Vorkommen leukozider Substanzen bei Staphylokokken erstreckten sich bisher nahezu ausschließlich auf Staphylokokken menschlicher Herkunft. Lediglich von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ lagen Angaben über 12 untersuchte Stämme vom Tier vor. Überhaupt war das einschlägige Zahlenmaterial gering und nicht immer miteinander vergleichbar, weil es mit verschiedenen Testmethoden und unter unterschiedlichen Bedingungen hinsichtlich der Kultivierungsmethoden der Staphylokokken und der Aufbereitung der Toxine entstanden war. Häufig war aus den Angaben nicht deutlich ersichtlich, um welches Leukozidin es sich in der Beschreibung handelte (VAN DE VELDE³⁹, VON LINGELSHEIM²⁴, NEISSER und WECHSBERG²⁷, GROSS¹⁵), weil den früheren Autoren (bis 1936) die Existenz mehrerer leukozider Substanzen nicht bekannt war. Sie verwendeten Kaninchenleukozyten als Testzellen und hatten somit ein sehr unspezifisches Testsystem zur Verfügung, da alle 3 leukoziden Substanzen auf Kaninchenleukozyten destruktiv wirksam waren.

2,21 PV-Leukozidin (PV)

Über die Häufigkeit des Vorkommens von PV-Leukozidin bei Staphylokokken gibt die Tab. 1 Auskunft. Dort sind die in der Literatur zu findenden Angaben hierüber zusammenfassend dargestellt, wobei die untersuchten Staphylokokkenkulturen nach ihrer Koagulaseaktivität aufgliedert sind, soweit Hinweise darüber vorlagen.

Tabelle 1

Aus der Literatur entnommene Angaben über die Häufigkeit PV-leukozydin⁺-positiver Staphylokokkenkulturen vom Menschen und Tier

Autoren	Koagulase	Zahl der untersuchten Staphylokokkenkulturen				
		vom Tier		vom Menschen		
		insgesamt	PV-leukozydin-positiv	insgesamt	PV-leukozydin-positiv	
PANTON und VALENTINE ³⁰	keine Angaben	-	-	22	17 = 77 %	
JOHANOWSKY ²⁰	positiv	-	-	476	436 = 92 %	
	negativ	-	-	-	-	
GLADSTONE und VAN HEYNINGEN ¹³	positiv	12	2 = 17 %	75	36 = 48 %	
	negativ	-	-	23	-	
IMPERATO et al. ¹⁶	positiv	-	-	27	10 = 37 %	
	negativ	-	-	16	5 = 31 %	

⁺PANTON-VALENTINE-Leukozydin

Die Ergebnisse der verschiedenen Autoren waren sehr unterschiedlich und z.T. widersprüchlich. So bewegten sich die Prozentzahlen für PV-Leukozidin bei koagulase-positiven Staphylokokken zwischen 37 % bei IMPERATO et al.¹⁶ und 92 % bei JOHANOWSKY²⁰. Das Vorkommen von PV-Leukozidin bei koagulase-negativen Staphylokokken konnten nur IMPERATO et al.¹⁶ zeigen. Von 16 untersuchten Kulturen waren 5 (= 31 %) PV-leukozidin-positiv. JOHANOWSKY²⁰ sowie GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ wiesen jedoch darauf hin, daß koagulase-negative Staphylokokken kein PV-Leukozidin bildeten. Unter 12 Kulturen vom Tier fanden GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ 2 (= 17 %) mit PV-Leukozidin. SVETOVIDOVA und LOBANOVA³⁵ ermittelten 129 PV-leukozidin-positive Staphylokokkenkulturen vom Menschen. Aus ihren Angaben ging nicht hervor, wieviel Kulturen sie insgesamt untersucht hatten.

Aus den bisherigen Untersuchungen über das Vorkommen von PV-Leukozidin bei Staphylokokken ließ sich erkennen, daß das PV-Leukozidin bei koagulase-positiven Staphylokokken vom Menschen verbreitet war und auch von Staphylokokken vom Tier gebildet wurde. Das Vorkommen bei koagulase-negativen Staphylokokken war umstritten.

2,22 NW-Leukozidin (NW)

In nur 2 systematischen Untersuchungen wurde die leukoide Wirkung des α -Hämolysins verfolgt (WRIGHT⁴⁹, PROOM³³). Bei den übrigen Autoren waren die Angaben darüber meistens beiläufiger Art. Es war die Möglich-

keit nicht auszuschließen, daß es sich bei dem Leukozidin aus früheren Untersuchungen, bei dessen Nachweis Kaninchenleukozyten als Testzellen verwandt wurden, teilweise um α -Hämolysin handelte, insbesondere wenn ähnliche Titer wie mit Hämolysin erzielt wurden (NEISSER und WECHSBERG²⁷, GROSS¹⁵). Von 33 untersuchten Staphylokokkenkulturen konnte WRIGHT⁴⁹ bei 26 (= 78,78 %) NW-Leukozidin nachweisen. Die Titer für NW-Leukozidin waren identisch mit den α -Hämolysintitern. PROOM³³ fand bei 8 Staphylokokkenkulturen Parallelität zwischen NW-Leukozidinaktivität und α -Hämolysinaktivität. Bei allen untersuchten Kulturen handelte es sich um Staphylokokken vom Menschen.

GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ untersuchten 1957 die leukozide Wirksamkeit eines noch unreinen α -Hämolysinpräparates ("S 883"⁽¹⁾) auf Kaninchenleukozyten. KUMAR und LINDORFER²³ trennten 1962 mit Hilfe des "continuous flow paper electrophoresis apparatus" das Rohtoxin des Staphylokokkenstammes Wood 46 elektrophoretisch auf und fanden in demselben Peak die NW-Leukozidinaktivität und α -Hämolysinaktivität wieder. PV-Leukozidin war nicht nachweisbar. Auch BERNHEIMER⁶ und GLADSTONE¹² konnten in einem hochgereinigten Präparat von α -Hämolysin aus dem Stamm Wood 46 NW-Leukozidin nachweisen. Über das Vorkommen von NW-Leukozidin bei Staphylokokkenstämmen vom Tier lagen keine Untersuchungen vor. Wenn α -Hämolysin und NW-Leukozidin identisch sind, ist mit einem Vorkommen auch bei Staphylokokken vom Tier zu rechnen.

(1) Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England

2,23 Leukolysin

Hinweise auf die leukolytischen Fähigkeiten des δ -Hämolysins fanden sich bei JACKSON und LITTLE¹⁷ 1956. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ zeigten an 11 Staphylokokkenkulturen die Parallelität in der Titerhöhe von δ -Hämolysin und Leukolysin. Von 75 koagulase-positiven Kulturen vom Menschen waren nach diesen Autoren 52 (~ 69 %) leukolysin-positiv, von 12 koagulase-positiven Kulturen vom Tier waren 8 (~ 66 %) und von 23 koagulase-negativen Kulturen 7 (~ 30 %) leukolysin-positiv. Von den insgesamt untersuchten 110 Kulturen erwiesen sich ~ 60 % als Leukolysinbildner. IMPERATO et al.¹⁶ wiesen bei 51 % von 43 untersuchten Staphylokokkenkulturen Leukolysin nach. In ihren Untersuchungen waren von 27 koagulase-positiven Stämmen ~ 44 % und von 16 koagulase-negativen ~ 62 % leukolysin-positiv. 1966 zeigten GLADSTONE und YOSHIDA¹⁴, daß ein von YOSHIDA⁵⁰ gereinigtes δ -Hämolysin leukolytische Wirksamkeit auf Leukozyten von mehreren Tierarten und vom Menschen besaß.

Wie die bisherigen Untersuchungen zeigten, war das Leukolysin bei koagulase-positiven und koagulase-negativen Staphylokokken vom Menschen und vom Tier häufig zu finden. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ betonten, daß die Titerhöhe von Leukolysin allgemein gering war. Eine MLeD von 40 wurde selten erreicht oder überschritten.

2,3 Nachweis des leukoziden Effektes bei Staphylokokken

Unter den beschriebenen Nachweismethoden für den leukoziden Effekt bei Staphylokokken waren prinzipiell 2 Techniken zu unterscheiden: Die direkte mikroskopische Methode und die indirekte Farbindikatormethode (Tab. 2).

2,31 Direkte mikroskopische Methode

Die direkte mikroskopische Beobachtung leukozidingeschädigter Kaninchenleukozyten wurde bereits von VAN DE VELDE³⁹ 1894 durchgeführt. Sie wurde von BAIL¹ 1898 und von VON LINGELSHEIM²⁴ 1900 übernommen, von PANTON und VALENTINE³⁰ 1932 modifiziert und an die Anwendung menschlicher Testzellen angepaßt. Von JOHANOWSKY²⁰ 1957 wurde sie erneut modifiziert.

Die direkte mikroskopische Methode beruhte darauf, daß die leukozytentötende Wirkung eines leukoziden Staphylokokkenproduktes an isolierten Leukozyten durch die Darstellung der morphologischen Veränderungen im mikroskopischen Bild sichtbar gemacht wurde. Von den Leukozyten kamen dabei nur die Granulozyten in Betracht. Man benutzte zur Darstellung das Phasenkontrastverfahren (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³), das Dunkelfeldverfahren (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³), ein differenzierendes Färbeverfahren (JOHANOWSKY²⁰), oder machte die Zerstörung der Granulozyten im Objektträgerausstrich sichtbar (PANTON und VALENTINE³⁰).

Tabelle 2 Einige Merkmale der verschiedenen Methoden zum Nachweis des leukozyden Effektes

Methoden (Autoren)	Testzellen	Herkunft der Testzellen	Gewinnung der Testzellen	Art der Verwendung der Testzellen	Redox-Farb-indikator
Direkte Methode	VAN DE VELDE ³⁹	Granulozyten	Kaninchen	aus Pleuraexsudat nach Injektion abgetöteter Staphylokokken	-
	PANTON und VALENTINE ³⁰	Granulozyten	Mensch	aus Venenblut durch Zentrifugieren und Waschen	-
	JOHANOWSKY ²⁰	Granulozyten	Mensch	aus Venenblut durch Zentrifugieren und Waschen	-
	GLADSTONE und VAN HEYNINGEN ¹³	Granulozyten	Mensch	aus Venenblut durch Objekträgeradhäsion	-
	NEISSER und WECHSBERG ²⁷	Granulozyten	Kaninchen	aus Pleuraexsudat nach Injektion von Aleuronataufschwemmung	Methylenblau
Indirekte Methode	JULIANELLE ²¹	Granulozyten	Meerschw.	aus Pleuraexsudat nach Injektion von Aleuronataufschwemmung	Methylenblau
	JENSEN und MALOE ¹⁹	Granulozyten	Kaninchen	aus Peritonealexsudat nach Injektion von 0,14 M NaCl	2,6-Dichlorphenol-indo-phenol
	WOODIN ⁴⁰	Makrophagen	Kaninchen	aus Peritonealexsudat nach Injektion von Paraffinum liquidum	2,6-Dichlorphenol-indo-phenol

2,32 Indirekte Farbindikatormethode

Die indirekte Farbindikatormethode wurde von NEISSER und WECHSBERG²⁷ 1901 als sog. "Bioskopische Methode" zum Nachweis leukozider Substanzen eingeführt. Ihr Prinzip bestand darin, daß lebende Zellen durch ihren stoffwechselbedingten Sauerstoffverbrauch einen Redox-Indikatorfarbstoff zu einer farblosen Verbindung reduzierten, während tote Zellen das nicht konnten. NEISSER und WECHSBERG²⁷, JULIANELLE²¹, GROSS¹⁵, PARKER, WELD und GUNTHER³², WRIGHT⁴⁹ und PROOM³³ verwendeten Methylenblau, JENSEN und MALOE¹⁹ und WOODIN⁴⁰ 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Indikatorfarbstoff.

2,4 Herstellung von Staphylokokkentoxinen mit leukozider Wirkung

Über die Bedingungen unter denen Staphylokokken das Leukozidin produzieren, lagen nur wenige Untersuchungen vor. VAN DE VELDE³⁹ kultivierte Staphylokokken zur Leukozidinbildung in der Pleuraflüssigkeit von Kaninchen und fand dann im Pleuraexsudat das Leukozidin. PANTON und VALENTINE³⁰ benutzten ein halbflüssiges Agarmedium zur Züchtung von Staphylokokken für den Zweck der Leukozidinproduktion. JOHANOWSKY²⁰ erzielte die höchsten Leukozidinkonzentrationen durch Kultivierung von Staphylokokken auf Zellophan. Die meisten Autoren (BAIL¹, VON LINGELSHEIM²⁴, NEISSER und WECHSBERG²⁷, JULIANELLE²¹, PARKER, WELD und GUNTHER³², GROSS¹⁵, JENSEN und MALOE¹⁹, GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³, WOODIN⁴⁰⁻⁴⁸, BÄNFFER²⁻⁴, IMPERATO et al.¹⁶) gewannen leukozide Substanzen aus Bouillonkulturen. Durch Zentrifugieren und anschließendes Filtrieren erhielten sie ein keimfreies Staphylokokkenkulturfiltrat, welches das leukozide Toxin darstellte.

Nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ ergab das sog. "L-Medium", ein modifiziertes Casein-Casein-Yeast Medium (CCY-Medium), eine optimale PV-Leukozidinbildung. Es wurde auch von WOODIN⁴⁰⁻⁴⁸, BÄNFFER²⁻⁴ und IMPERATO et al.¹⁶ verwendet. Wichtig war eine gute Belüftung der Kulturen. CO₂ in Konzentrationen höher als 10 % sollte die PV-Produktion hemmen. Gleichfalls hemmend sollte eine zu hohe Konzentration an Hefeextrakt in diesem Medium wirken. Außerdem erzielte WOODIN⁴⁷ mit "Yeatex" oder "Oxoid"-Hefeextrakt eine 20-fach höhere Leu-

kozidinausbeute als mit dem Hefeextrakt der Firma "Difco".

Als besten PV-Leukozidin produzierenden Staphylokokkenstamm empfahlen GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ den Stamm "V8". Er wurde ebenfalls von WOODIN⁴⁰⁻⁴⁸ und BÄNFFER²⁻⁴ benutzt.

Unterschiedliche Angaben waren über das zeitliche Auftreten und das Optimum der Leukozidinproduktion in Bouillonkulturen zu finden. Bei den früheren Untersuchern waren meist längere Bebrütungszeiten für die Staphylokokkenkulturen notwendig, um meßbare Leukozidinkonzentrationen feststellen zu können. Bei den Untersuchungen von NEISSER und WECHSBERG²⁷ trat die erste feststellbare Leukozidinmenge in der Bouillonkultur erst nach 4 Tagen auf. Am 8. Tag war das Optimum erreicht, das bis zum 16. Tag anhielt. Danach war ein stetiger Abfall zu verzeichnen. JULIANELLE²¹ fand zwischen 4. u. 8. Bebrütungstag Leukozidinaktivität, während vorher und nachher keine nachzuweisen war. PARKER, WELD und GUNTHER³² bebrüteten die Kulturbouillon 10 bis 16 Tage, während VALENTINE³⁷ nach 24 Stunden das Wachstum abbrach und bereits Leukozidin feststellte. Auch VAN DE VELDE³⁹ konnte in 24 Stunden alten Bouillonkulturen Leukozidin finden. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ erreichten schon nach etwa 10-stündiger Bebrütung die maximalen Leukozidinkonzentrationen, die bis zu 18 Stunden anhielten.

WOODIN^{40,47} gab je nach Kulturbedingungen 8 bis 10 oder 20 bis 24-stündiges Wachstum der Staphylokokken bis zur optimalen Leukozidinproduktion an.

2,5 Reindarstellung leukozider Substanzen von Staphylokokken

Bisher gab es nur Versuche zur Reinigung von PV-Leukozidin. Die Reindarstellung von NW-Leukozidin und Leukolysin ist noch nicht beschrieben worden. Lediglich Reinigungsversuche von α -Hämolysin und δ -Hämolysin sind bekanntgeworden.

Die Darstellung einer reinen antigenen PV-leukoziden Substanz gelang WOODIN⁴¹ 1960. Aus dem in mehreren 100 l CCY-Bouillon kultivierten V8-Stamm gewann er durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat ein Rohtoxin, das er zur Reindarstellung von PV-Leukozidin verwandte. Die Reinigung umfaßte viele Einzelschritte, die zunächst zur Anreicherung, dann zur teilweisen Reinigung, zur Fraktionierung in 2 Komponenten ("F" und "S") und schließlich zur Reinigung der einzelnen Komponenten bis zur kristallinen Darstellung führten. Im einzelnen bestand der komplizierte Reinigungsprozeß aus fraktionierten Fällungen mit absteigenden Konzentrationen von Ammoniumsulfatlösungen, Fraktionierung durch wiederholte Chromatographie auf Hydroxylapatit, Konzentrierung durch Chromatographie auf einer Carboxymethylcellulose-Säule (CM) und anschließender Fraktionierung auf CM in eine schnell ("fast") laufende "F-Fraktion" und eine langsam ("slow") laufende "S-Fraktion".

Diese beiden Fraktionen konnten durch Chromatographie auf Dowex-2 (x 8) und anschließend Amberlite CG-50 von Verunreinigungen, vor allem

DNase befreit werden. Sie ließen sich durch Aus-
salzen mit Ammoniumsulfat in kristalliner Form
darstellen. WOODIN⁴¹ konnte zeigen, daß sie sich
immunologisch als je eine einzige antigene Sub-
stanz verhielten.

2,6 Zellschädigende Effekte der leukoziden Substanzen

2,61 Wirkung auf Granulozyten

Die Wirkung von PV - L e u k o z i d i n auf Granulozyten des Menschen ist eingehend von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ beschrieben worden. Danach veränderte sich der durch PV-Leukozidin geschädigte Granulozyt des Menschen im phasenkontrastmikroskopischen Bild in zeitlicher Aufeinanderfolge folgendermaßen: Zunächst verlor er seine Motilität und rundete sich durch Einziehen der Pseudopodien mehr und mehr ab, so daß die Zelle schließlich kugelrund erschien. Vorübergehend traten zuweilen blasige Ausbeulungen des Protoplasmas auf, die den Zusammenhalt mit der Zelle verlieren und sich als kugelige Gebilde in das Medium ablösen konnten. Die Granula verloren ihre strömende Bewegung und gingen in Brownsche Molekularbewegung über. Nach und nach verschwanden die meisten Granula oder traten aus der Zelle aus. Die verbliebenen Granula verloren ihre Brownsche Molekularbewegung und legten sich dicht an die Zellwand an. Der Zellkern hatte in der Zwischenzeit seine Lappung verloren und war rund und deutlich sichtbar geworden. Nach längerer Einwirkungsdauer wurde er undeutlich und verschwand schließlich ganz, so daß die Zelle als leere Blase mit vereinzelt peripher gelagerten Granula zurückblieb. Niemals jedoch sollte sich die Zelle vollständig auflösen.

Die gleichen Veränderungen beschrieben DENYS und VAN DE VELDE⁸ für Kaninchengranulozyten.

Über die Wirkung von PV-Leukozidin auf die Granulozyten anderer Tierarten berichteten GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³, daß sich Granulozyten vom Schaf, der Maus und vom Meerschweinchen völlig unempfindlich zeigten. Von früheren Autoren lagen ähnliche Untersuchungen vor, jedoch war nicht bekannt, um welche leukozide Substanz es sich handelte. So berichtete VON LINGELSHEIM²⁴, daß Leukozyten vom Meerschweinchen und der Maus weniger empfindlich waren als Kaninchenleukozyten. Leukozyten vom Frosch erwiesen sich als gänzlich unempfindlich. VAN DE VELDE³⁹ konnte an Leukozyten vom Hund keine Veränderungen durch Leukozidin feststellen.

Somit wurde eine definitive Wirkung von PV-Leukozidin bisher lediglich auf Granulozyten vom Menschen und Kaninchen festgestellt. Die leukozide Wirkung war nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ bei beiden Leukozytenarten gleichstark.

Ein ebenfalls spezifisches Bild der morphologischen Veränderungen an Granulozyten beschrieben GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ für die Wirkung von L e u k o l y s i n : Es zeigte sich in der vollständigen Lyse der Zellen. Bevor die Zellen zur Lyse kamen, erfuhren sie eine charakteristische Veränderung ihrer Gestalt. Sie betraf hauptsächlich den Kern. Er verlor seine lappige Struktur und schwoll an, so daß er die Zelle bauchig

erweiterte und die Granula an eine Seite preßte. Dabei ergab die Zelle das Bild eines Siegelringes.

Die Wirkung von Leukolysin wurde von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ an Granulozyten vom Menschen, Kaninchen, Meerschweinchen und der Maus beobachtet.

Mit einem von YOSHIDA⁵⁰ gereinigten δ -Hämolysin konnten GLADSTONE und YOSHIDA¹⁴ leukolytische Zellschädigungen an Granulozyten vom Menschen, Kaninchen, Meerschweinchen, der Maus, der Ratte, der Taube und vom Huhn erzielen.

NW - L e u k o z i d i n (α -Hämolysin) wirkte nach Berichten von VALENTINE³⁷, WRIGHT⁴⁹, PROOM³³, GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ und GLADSTONE¹² leukozid auf die Granulozyten vom Kaninchen. Ein Effekt auf menschliche Granulozyten konnte von diesen Autoren nicht festgestellt werden. Über die Wirkung auf Granulozyten anderer Arten lagen keine Untersuchungen vor.

Die morphologischen Veränderungen von Kaninchengranulozyten haben VALENTINE³⁷ und PROOM³³ charakterisiert: Die Zellen wurden weniger typisch und weniger stark geschädigt als durch PV-Leukozidin. Es erfolgte keine Degranulation, die Granula verklumpten lediglich. Die Zelle als Ganzes rundete sich ab und der Zellkern trat deutlich in Erscheinung.

Es wurden nicht immer alle Zellen geschädigt und der Grad der Schädigung war uneinheitlich. Die Unterscheidung von lebenden Zellen war den Autoren nicht immer möglich.

2,62 Wirkung auf Erythrozyten

PV - L e u k o z i d i n war nach VALENTINE³⁷, WRIGHT⁴⁹, GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ auf Erythrozyten aller bisher untersuchten Arten unwirksam und verursachte keine Hämolyse. Deshalb wurde es von VALENTINE³⁷ 1936 als eigentliches Leukozidin bei Staphylokokken angesehen. Er nannte es das "wahre Leukozidin".

NW - L e u k o z i d i n (α -Hämolysin) war nach GLADSTONE¹² in hochgereinigter Form hämolytisch wirksam auf rote Blutzellen von einer Reihe von Tierarten, jedoch in sehr unterschiedlicher Konzentration. Am empfindlichsten erwiesen sich Erythrozyten des Kaninchens, dann solche der Maus, des Hundes, der Ratte, des Schweines, des Schafes, von Rhesus Affen, der Ente, der Ziege, des Rindes, des Menschen, der Taube, des Pferdes und des Meerschweinchens. Die Erythrozyten des Kaninchens waren 149 x empfindlicher als die des Menschen. Jedoch bestanden individuelle Unterschiede.

L e u k o l y s i n wirkte nach GLADSTONE¹² auf die Erythrozyten aller Tierarten, die bisher getestet worden waren, hämolytisch. Im Gegensatz zu α -Hämolysin war die unterschiedliche Empfind-

lichkeit gegenüber den verschiedenen Tierarten nach den Angaben dieses Autors nicht so ausgeprägt. Erythrozyten vom Menschen und vom Kaninchen waren ein wenig empfindlicher als die vom Meerschweinchen, der Maus, vom Schaf und vom Huhn. Weniger empfindlich sollten Erythrozyten des Pferdes sein.

2,63 Wirkungen auf andere Blutzellen, Makrophagen und Lysosomen

WOODIN⁴⁰ fand PV - L e u k o z i d i n auf Makrophagen vom Kaninchen wirksam und benutzte diese Zellen zum Nachweis des PV-Leukozidins. Nach GLADSTONE¹² wurden auch Makrophagen vom Menschen durch PV-Leukozidin zerstört, während sich die Makrophagen vom Meerschweinchen und der Maus als resistent erwiesen.

BERNHEIMER und SCHWARTZ⁷ untersuchten die Wirkung von gereinigtem PV-Leukozidin auf Lysosomen aus Kaninchengranulozyten und fanden keine Zerstörung dieser Zellpartikel.

VAN DE VELDE³⁹ beobachtete eine schädigende Wirkung auf Hämatoblasten und auf Ganglienzellen des Sympathikus.

NW - L e u k o z i d i n sollte auf Makrophagen vom Kaninchen, Menschen und der Maus leukozid wirksam sein (GLADSTONE¹²) und Lysosomen aus Kaninchengranulozyten zur Lysis bringen (BERNHEIMER und SCHWARTZ⁷). JELJASZEWICZ et

al.¹⁸ stellten eine Zerstörung der Thrombozyten fest.

Makrophagen des Menschen, vom Kaninchen, Meerschweinchen und der Maus wurden von L e u - k o l y s i n zerstört (GLADSTONE¹²). Ebenfalls war Leukolysin auf Lymphozyten der Ratte, Mastzellen der Maus (GLADSTONE¹²) und Lysosomen aus Kaninchengranulozyten (BERNHEIMER und SCHWARTZ⁷) lytisch wirksam.

2,64 Wirkung auf Gewebekulturzellen

Die Wirkung von P V - L e u k o z i d i n auf einige Gewebekulturzellen wurde von KORBECKI und JELJASZEWICZ²² an Hand eines gereinigten Präparates untersucht. Sie stellten keinen Effekt von KB-, HEp-2-, L- und Affennierenzellen fest. In jüngster Zeit berichtete OGURTSOV²⁸ über einen zytopathogenen Effekt an HeLa-Zellen durch PV-leukoide Staphylokokkenfiltrate.

NW -L e u k o z i d i n erwies sich nach KORBECKI und JELJASZEWICZ²² für KB-, L- und Affennierenzellen als zytopathogen.

Tabelle 3

Herkunft der Staphylokokkenkulturen

Herkunft	Mensch	Rind	Hund
Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford	1	-	-
Bundesanstalt für Milch- wirtschaft, Inst. für Milchhygiene, Kiel	-	89	-
Staatl. Tierärztl. Unter- suchungsamt, Aulendorf	-	28	-
Staatl. Med.-Untersuchungs- amt, Dillenburg	13	-	-
Staatl. Vet.-Untersuchungs- amt, Braunschweig	-	3	-
Inst. für Hygiene und Mikro- biologie der Medizinischen Akademie in Düsseldorf	15	-	-
Inst. für Med. Hygiene der Universität Gießen, Gießen	38	-	-
Inst. für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen	-	-	52
Gesamtzahl	68	120	52

3,0 Material und Methoden

3,1 Material

3,11 Staphylokokkenkulturen

Als Untersuchungsmaterial dienten 240 Staphylokokkenkulturen verschiedener Herkunft (Tab. 3).

Für die Herstellung von PV-Leukozidin-Konzentraten wurde ausschließlich der Stamm V8 verwendet, den mir dankenswerterweise Herr Dr. Gladstone⁽¹⁾, Oxford, in lyophilisierter Form zur Verfügung stellte.

3,12 Myxamöben

Eine Kultur von Dictyostelium discoideum erhielt ich von Herrn Dr. Gerisch⁽²⁾, Freiburg.

3,13 Nährsubstrat für Myxamöben

Als Nährsubstrat zur Kultivierung der Myxamöben diente Escherichia coli B/2. Eine Schrägagarkultur dieses Stammes schickte mir Herr Dr. Gerisch⁽²⁾, Freiburg.

(1) Sir William Dunn School of Pathology,
University of Oxford, Oxford

(2) Zoologisches Institut der Universität in
Freiburg, Breisgau

3,14 Nährmedien

3,141 Feste Nährmedien

3,1411 Zur Kultivierung von Staphylokokken

Als festes Nährmedium für Staphylokokkenkulturen diente "Nutrient-Agar"⁽¹⁾, der nach Angaben der Herstellerfirma bereitet und als Schrägagar steril in Kulturröhrchen ausgegossen wurde. Zur Anfertigung von Blutagarplatten wurde ein Agarmedium hergestellt, das sich aus 0,1 % Pepton⁽²⁾, 0,5 % Fleischextrakt nach Liebig, 0,2 % Natriumdiphosphat, 0,3 % Natriumchlorid und 2 % Agar⁽³⁾ zusammensetzte. Dem noch flüssigen Medium wurden je nach Zweck der Untersuchung 5 % oder 10 % steriles Schüttelblut vom Schaf, Kaninchen oder Menschen hinzugefügt.

3,1412 Zur Kultivierung von Myxamöben

Zur Kultivierung von Dictyostelium discoideum mit Escherichia coli B/2 wurde ein Glukose-Pepton-Agarmedium (GPA) verwandt, das nach Angaben von Gerisch⁽⁴⁾

(1) Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan, USA

(2) E. Merck AG, Darmstadt

(3) Riedel-de Haen AG, Seelze, Hannover

(4) persönliche Mitteilung

folgende Zusammensetzung hatte: 1 g Pep-ton⁽¹⁾, 1 g Glukose, 15 g Agar, 1000 ml 1/60 M Phosphatpuffer nach SÖRENSEN von pH 6,0.

3,142 Flüssige Nährmedien

3,1421 Zur Kultivierung von Staphylokokken

3,14211 Modifizierte L-Medien

Für erste orientierende Versuche zur Kultivierung von Staphylokokken für die Leukozidinproduktion kam das L-Medium nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ zur Anwendung, das hier die Bezeichnung "L-O₂-Medium" ("L-O₂") erhielt. Es wurde nach den Angaben dieser Autoren bereitet. Als Hefeextrakt diente das Präparat der Firma Oxoid⁽²⁾.

Weitere 5 Modifikationen des L-O₂-Mediums wurden vorgenommen und erhielten die Bezeichnungen "L-O₁", "L-O₃", "L-M₁", "L-M₂" und "L-M₃". Alle Medien hatten dieselbe Grundzusammensetzung wie das L-Medium (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³), modifiziert war jeweils nur die Herkunft, Konzentration und Aufbereitung des Hefeextraktes.

(1) E. Merck AG, Darmstadt

(2) Oxoid Limited, London, S.E. 1

L-O₁ : Sechzig g Oxoid-Hefeextrakt wurden in 90 ml Aqua dest. gelöst, in einen Dialysierschlauch⁽¹⁾ von 2,8 cm Durchmesser gefüllt und gegen 1000 ml Aqua dest. 24 Std. bei 4° C unter ständigem Rühren dialysiert. Das so gewonnene Hefediffusat wurde mit den übrigen Substanzen des Mediums zu 1 l vereint.

L-O₃ : Wenn nicht anders beschrieben, wurde stets dieses Medium verwandt.

Zehn g Oxoid-Hefeextrakt wurden in 30 ml Aqua dest. gelöst und wie bei L-O₁ gegen 1000 ml Aqua dest. dialysiert. Das auf diese Weise gewonnene Hefediffusat wurde mit den übrigen Substanzen zu 1 l Medium vereint.

L-M₁ : Dieses Medium wurde wie L-O₁ bereitet. Statt Oxoid-Hefeextrakt wurde Merck⁽²⁾-Hefeextrakt verwendet.

L-M₂ : Das L-M₂-Medium wurde wie das L-O₂-Medium hergestellt. Statt Oxoid-Hefeextrakt kam Merck-Hefeextrakt zur Anwendung.

L-M₃ : L-M₃ wurde wie L-O₃ gewonnen. Es wurde statt Oxoid-Hefeextrakt Merck-Hefeextrakt verwendet.

(1) Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich

(2) E. Merck AG, Darmstadt

3,14213 Trypticase-Soy-Broth (TSB)

Für vergleichende Versuche wurden Staphylokokken auch in TSB kultiviert. Das Medium wurde nach den Angaben der Herstellerfirma⁽¹⁾ zubereitet.

3,14214 Brucella-Broth (BB)

Ebenfalls für vergleichende Versuche wurden Staphylokokken in BB gezüchtet. Das Medium wurde nach Angaben der Herstellerfirma⁽²⁾ bereitet.

Alle Bouillons wurden mit 4 n NaOH auf pH 7,4 gebracht und anschließend 15 Min. bei 121° C und 1,1 atü autoklaviert.

3,1422 Zur Kultivierung von Escherichia coli B/2

Zur Züchtung von Escherichia coli B/2 in flüssigem Medium wurde TSB verwendet.

3,15 Blut zur Isolierung von Leukozyten

Zur Isolierung von lebenden Granulozyten wurde frisches Blut von verschiedenen Tieren und vom Menschen benötigt.

(1) Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland, USA

(2) Albimi Laboratories, New York, USA

Das Blut vom Menschen stammte von Patienten der Medizinischen Poliklinik⁽¹⁾, von meinen Institutskollegen und von mir. Blut vom Kaninchen und Meerschweinchen wurde durch Herzpunktion von Labortieren gewonnen. Pferde- und Hundeblut stammte von Patienten der Medizinischen Veterinärklinik⁽²⁾. Das Blut von Rindern und Schweinen wurde Schlachttieren auf dem Schlachthof⁽³⁾ entnommen. Schafblut erhielt ich von Institutstieren durch Punktion der Vena jugularis.

3,16 Physiologische Puffermedien

3,161 Zum Präparieren von Leukozyten

3,1611 Phosphat-Puffer-Lösung (PPL)

PPL wurde nach den Vorschriften von PARKER³¹ hergestellt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde ausschließlich dieser Puffer zur Herstellung der Leukozytensuspensionen und zur Verdünnung von Toxinen verwandt.

(1) Medizinische Kliniken und Polikliniken der Justus Liebig-Universität in Gießen

(2) Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik und Medizinische Poliklinik der Justus Liebig-Universität in Gießen

(3) Städtischer Schlachthof in Gießen

3,1612 Gelatine-Phosphatpuffer

Für den Leukozidinnachweis nach der Methode von WOODIN⁴⁰ kam der Gelatine-Phosphatpuffer nach WOODIN⁴⁰ zur Anwendung.

3,1613 Gelatine-Kochsalzlösung

Für die Methode nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ zum Nachweis von Leukozidin wurde Gelatine-Kochsalzlösung (0,5 % Gelatine in 0,14 M NaCl) nach den Vorschriften dieser Autoren bereitet.

3,1614 Der Leukozidinnachweis nach JOHANOWSKY²⁰ erforderte die Herstellung einer Tyrodelösung. Sie wurde nach den Angaben von PARKER³¹ angefertigt.

3,162 Zur Kultivierung von Myxamöben

Zur Züchtung von Dictyostelium discoideum mit Escherichia coli B/2 wurde nach GERISCH¹¹ ein 1/60 M Phosphatpuffer nach SÖRENSEN verwandt, der einen pH-Wert von 6,0 besaß.

3,17 PV-Leukozidin

Als Standardpräparat zur Darstellung von PV-Leukozidin diente ein durch Präzipitation mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung konzentrierter Kulturüberstand einer Bouillonkultur des Staphylokokkenstammes V8. Das Präzipitat war in PPL gelöst und wurde in 1 ml-Portionen bei -20°C aufbewahrt. Es besaß 8192 MLeD PV-Leukozidin (für Granulozyten vom Menschen) und 64 MHD α -Hämolysin (für Kaninchenerythrozyten). β -Hämolysin und δ -Hämolysin (Leukolysin) waren nicht nachzuweisen.

3,18 NW-Leukozidin

Als NW-Leukozidin wurde der Kulturüberstand einer Bouillonkultur des Staphylokokkenstammes SAB verwendet. Auch er wurde in 1 ml-Portionen bei -20°C aufbewahrt. Er enthielt 128 MLeD NW-Leukozidin (für Kaninchengranulozyten), 128 MHD α -Hämolysin (für Kaninchenerythrozyten) und 4 MLeD PV-Leukozidin (für Granulozyten vom Menschen). δ -Hämolysin (Leukolysin) und β -Hämolysin waren nicht vorhanden.

3,19 Leukolysin

Zur Darstellung von Leukolysin diente der Kulturüberstand einer Bouillonkultur des Staphylokokkenstammes Co III, dessen PV-Leu-

kozidin-Aktivität durch Erhitzen bei 60° C/30 Min. zerstört worden war. Seine toxische Aktivität für Menschen-Granulozyten betrug 16 MLeD und für Erythrozyten vom Menschen 32 MHD. PV-Leukozidin und α -Hämolysin (NW-Leukozidin) konnten nicht nachgewiesen werden. β -Hämolysin war mit 512 MHD für Erythrozyten vom Schaf vorhanden. Das Präparat wurde bei $- 20^{\circ}$ C aufbewahrt.

3,2 Methoden

3,21 Isolierung lebender Granulozyten

3,211 Aus dem Peritonealexsudat

In Anlehnung an JENSEN und MALOE¹⁹ wurden Granulozyten des Kaninchens aus dem Peritonealexsudat nach wiederholter Injektion einer sterilen 0,14 M NaCl in die Peritonealhöhle gewonnen.

Je nach Größe der Tiere wurden etwa 200 - 500 ml 0,14 M NaCl injiziert. Im Abstand von 24 Std. wurde die Injektion 2 - 3 x wiederholt. Sechzehn Std. nach der letzten Injektion wurden erneut 100 - 200 ml 0,14 M NaCl injiziert und nach gründlicher Massage punktiert. Das weißlich trübe Punktat enthielt gewöhnlich $5 \cdot 10^3$ - 10^5 Granulozyten pro ml. Es wurde dann durch 4 Mullagen filtriert, um es von Verklumpungen zu befreien. Bei 650 x g (10 Min.) wurden die Zellen abzentrifugiert, 3 x in PPL gewaschen und schließlich in 20 ml PPL resuspendiert. Mit einer Thoma-Zählkammer⁽¹⁾ wurde die Zellkonzentration ermittelt. Durch Verdünnen mit PPL konnte dann jede gewünschte Zelldichte eingestellt werden.

(1) W. Schreck, Hofheim/Taunus

Mit einer solchen Suspension oder mit dem Punktat selbst konnte auch die Objektträgeradhäsion (siehe dort) durchgeführt werden.

3,212 Zur Isolierung lebender Granulozyten aus dem Blut wurden 3 Methoden angewandt, nämlich die Objektträgeradhäsion, die Isolierung nach Hämolyse der Erythrozyten mit anschließender Objektträgeradhäsion und die Isolierung aus der Leukozytenschicht ("buffy coat") mit anschließender Objektträgeradhäsion.

3,2121 Objektträgeradhäsion

Lebende Granulozyten wurden nach der Methode von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ dadurch gewonnen, daß man sie aufgrund ihrer amöboiden Eigenbeweglichkeit auf die Oberfläche eines Objektträgers auswandern und sich dort festheften ließ. Die Objektträger (7,5 x 5,0 cm) waren zuvor in Chromschwefelsäure, Petroläther, Leitungswasser, destilliertem und bi-destilliertem Wasser sorgfältig gereinigt und mit einer Parafilmschicht⁽¹⁾ versehen worden. In die Parafilmschicht wurden vorher mit einem Papierlocher 10 Löcher mit einem Durchmesser von 5,0 mm in 2 Reihen gestanzt. Die Parafilmschicht wurde

(1) Parafilm "M", American Can Company, Neenah, Wisconsin

bei 150° C an den Objektträger angeschmolzen. Nach Erkalten waren diese Parafilm-Objektträger (im folgenden mit P-O bezeichnet) gebrauchsfertig und wurden staubfrei aufbewahrt. Frisches Blut wurde direkt nach der Entnahme im ungeronnenen Zustand auf die freien Felder eines P-O getropft. Solche mit 10 Blutropfen versehenen P-O wurden in einer feuchten Kammer 30 Min. bei 37° C bebrütet. Dabei gerannen die Bluttröpfchen und die Granulozyten hefteten sich an der Glasoberfläche fest. Nach der Inkubation wurden die Blutkoagula mit PPL aus einer Spritzflasche abgespült. Wenn das genügend vorsichtig geschah, haften an jedem freien Feld des P-O etwa 100 - 1000 lebende Granulozyten. Solche Präparate waren bei Aufbewahrung in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur 4 - 6 Std. für einen Leukozydentest verwendbar.

3,2122 Isolierung nach Hämolyse mit anschließender Objektträgeradhäsion

Nach BEHRENS und ESCH⁵ wurden Leukozyten durch Hämolyse der Erythrozyten und anschließendem Zentrifugieren gewonnen.

Das mit Natriumcitratlösung versehene Blut (20 Teile einer 3,8 %igen Na-Citratlösung mit 80 Teilen Blut) wurde unter

ständigem Rühren mit dem doppelten Volumen Aqua dest. zur Hämolyse gebracht. Die Hämolysezeit wurde mit der Stoppuhr überwacht und dauerte bei dem Blut vom Rind 45 Sek., dem vom Pferd und Schaf 65 Sek. und dem vom Hund 70 Sek.. Danach wurde mit 0,77 M NaCl-Lösung isotonisch gemacht. Die Menge der NaCl-Lösung richtete sich nach der verwendeten Citratblutmenge (1 Teil der NaCl-Lösung, 2 Teile Citratblut).

Aus dem hämolysierten Blut wurden bei 650 x g (15 Min.) die Leukozyten abentrifugiert und 3 x in PPL gewaschen und schließlich in PPL resuspendiert. Noch vorhandene Erythrozyten und die Lymphozyten wurden durch die oben beschriebene Objektträgeradhäsion entfernt. Die Leukozytensuspension wurde in einer Zellkonzentration von 10^4 /ml mit Hilfe einer 0,02 ml Mikropipette⁽¹⁾ auf die Felder eines P-O getropft. Dann wurde wie oben beschrieben weiterverfahren. Die Granulozyten blieben in der gewünschten Zelldichte von 500 - 1000 Zellen pro Feld haften, während Erythrozyten und Lymphozyten mit PPL fortgespült wurden.

(1) Mikropipette Marburg, Eppendorf Gerätebau, Netheler u. Hinz, Hamburg

3,2123 Isolierung aus der Leukozytenschicht
("buffy coat") mit anschließender Objektträgeradhäsion

Citratblut wurde bei 1160 x g (10 Min.) zentrifugiert und mit einem Mikropipettiergerät⁽¹⁾ die Leukozytenschicht vorsichtig abgesaugt, in PPL gewaschen und erneut bei 1160 x g (5 Min.) zentrifugiert. Die wiederum vorhandene Leukozytenschicht wurde erneut abpipettiert, gewaschen und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis eine Leukozytenschicht angereichert war, aus der nahezu reine Leukozyten abgesaugt werden konnten. Davon wurde eine Zellsuspension in PPL von 10^4 Zellen/ml hergestellt. Mit Hilfe der Objektträgeradhäsion (siehe bei 3,2121) wurden die Granulozyten aus der Suspension isoliert.

3,22 Isolierung lebender Makrophagen

Makrophagen wurden aus dem Peritonealexsudat von Kaninchen gewonnen. Achtzig ml steriles Paraffinum liquidum (WOODIN⁴⁰) wurde in die Peritonealhöhle eingespritzt. Vier bis 6 Tage danach enthielt das Bauchhöhlen-Exsudat (siehe bei 3,211) bis zu 90 % Makrophagen. Nach dreimaligem Waschen in 0,14 M NaCl und Abzen-

(1) in eigener Werkstatt hergestellt

trifugieren bei 650 x g (10 Min.) wurde das Sediment aus Makrophagen in PPL resuspendiert und auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

3,23 Kultivierung von Myxamöben

3,231 Auf festem Medium

Die vom Schrägagar abgeimpften Sporen von Dictyostelium discoideum wurden zusammen mit Escherichia coli B/2 auf GPA ausgestrichen. Das Wachstum dauerte 2 - 3 Tage bei Zimmertemperatur.

3,232 In flüssigem Medium

Die Züchtung der als Nährsubstrat dienenden Bakterien von Escherichia coli B/2 erfolgte in TSB bei 37° C/48 Std. Nach Abzentrifugieren bei 16 300 x g wurden die Bakterien in 1/60 M Phosphatpuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und in Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit Sporen von Dictyostelium discoideum beimpft und bei Zimmertemperatur geschüttelt. Durch mikroskopische Kontrolle konnte das Amöbenwachstum verfolgt werden. Wenn eine genügende Zelldichte erreicht war, wurde das Wachstum gestoppt und nach dem Verfahren von GERISCH¹⁰ eine Amöbensuspension hergestellt.

3,24 Kultivierung von Staphylokokken zur Leukozydinproduktion

3,241 Herstellung kleiner Mengen eines Kulturüberstandes

Der zu kultivierende Staphylokokkenstamm wurde vom Schrägagar auf eine Schafagarblutplatte ausgestrichen und 24 Std. bei 37° C bebrütet. Davon wurde eine Öse voll in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 5 ml Bouillon überimpft. Diese Vorkultur wurde 24 Std. bei 37° C auf einer Schüttelmaschine bebrütet. Von der Vorkultur wurden 1 ml in 9 ml frische Bouillon pipettiert, die in einem 200 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt war. Diese Endkultur wurde 17 Std. bei 37° C auf der Schüttelmaschine bebrütet, dann bei 16 300 x g bei 4° C 30 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder sofort geprüft oder bei - 20° C aufbewahrt.

3,242 Herstellung großer Mengen eines Kulturüberstandes

Für die Endkultur wurden 2-Liter-Kolben mit 90 ml Bouillon verwendet, die mit 10 ml Vorkultur (siehe bei 3,241) beimpft wurden. Nach 17-stündiger Bebrütung bei 37° C auf der Schüttelmaschine wurde durch Zentrifugieren bei 16 300 x g der Kulturüberstand durch vorsichtiges Abgießen gewonnen.

3,25 Konzentrierung von PV-Leukozidin

Ein 1 Kulturüberstand des Staphylokokkenstammes V8 wurde in einen Dialysierschlauch gefüllt und gegen 10 l gesättigte Ammoniumsulfatlösung 24 Std. bei 4° C dialysiert. Dabei kam es zur Präzipitation der Proteine des Kulturüberstandes. Diese wurden bei 16 300 x g (40 Min.) abzentrifugiert, in 20 ml PPL bei 4° C aufgelöst und in einem Dialysierschlauch gegen 1 l PPL 2 Tage dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei 4° C und täglich zweimaligem Wechsel des Puffers. Das konzentrierte Toxin wurde in 1 ml-Portionen bei - 20° C aufbewahrt.

3,26 Nachweis des leukoziden Effektes

3,261 Direkte mikroskopische Methode

Zum direkten Nachweis des leukoziden Effektes wurde in enger Anlehnung an die von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ beschriebene Methode verfahren.

Von der zu testenden Probe wurde ein Tropfen von 0,02 ml mit Hilfe einer Mikropipette auf einen mit Granulozyten behafteten Parafilm-Objektträger (siehe 3,2121) gebracht und 30 Min. in einer feuchten Kammer bei 37° C bebrütet. Zur mikroskopischen Beobachtung wurde ein Deckglas über die Präparation gelegt und im Phasenkontrastlicht bei 320-facher Vergrößerung mit einem Zeiss-Objektiv⁽¹⁾ beobachtet.

(1) Neofluar 40/0,75, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

Dabei wurden die morphologischen Veränderungen, die an lebenden Granulozyten durch Leukozidineinwirkung entstehen (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³), als Kriterium für die Beurteilung des leukoziden Effektes angesehen (siehe 2,6111 und Abb. 1). Als Kontrolle diente eine Granulozytenpräparation, die mit 0,02 ml PPL unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Bei ihr durften keine morphologischen Veränderungen an den Granulozyten auftreten. Diese Methode wurde, wenn nicht anders angegeben, ausschließlich zum Nachweis des leukoziden Effektes angewandt.

Für vergleichende Untersuchungen wurde auch die Methode von JOHANOWSKY²⁰ benutzt und nach der Originalvorschrift ausgeführt.

3,262 Indirekte Farbindikatormethode

Die indirekte Bestimmung des leukoziden Effektes wurde nach den Methoden von JENSEN und MALOE¹⁹ und WOODIN⁴⁰ durchgeführt. Beide unterschieden sich lediglich in der Art der verwendeten Testzellen. Bei der WOODIN'schen Methode waren es Makrophagen, bei der anderen Granulozyten vom Kaninchen.

Vor der Ausführung des Testes mußte die Testzellensuspension jeweils erneut standardisiert werden. Zu dem Zweck wurde von ihr die "Dosis minima reducens" (NEISSER

und WECHSBERG²⁷) bestimmt: Es wurde die Zellsuspension derart verdünnt, daß 0,02 ml gerade noch imstande waren, 0,01 ml einer 0,05 %igen Lösung von 2,6-Dichlor-phenol-indophenol (DPI) vollständig innerhalb von 10 Min. bei 37° C zu entfärben. Die ermittelte Zellverdünnung war die Dosis minima reducens. Zum Test wurde die doppelte Dosis minima reducens verwendet.

Die Testreaktionen wurden in Reagenzröhrchen (8,0 mm Durchmesser, 6,9 cm Länge) durchgeführt: Mit einer Mikropipette wurden 0,02 ml des zu testenden Toxins in ein Röhrchen gegeben. Dann wurden 0,02 ml der standardisierten Granulozyten- oder Makrophagensuspension hinzugefügt, gut umgeschüttelt und bei 37° C 30 Min. bebrütet. Danach wurden 0,01 ml der DPI-Lösung und 0,01 ml einer $1,69 \cdot 10^{-3}$ KCN-Lösung dazugegeben und 10 Minuten weiter bebrütet. Dann wurde die Reaktion abgelesen.

Die leukozide Wirkung war an der vollständigen Entfärbung des blauen Farbindikators zu erkennen. Bei negativer Reaktion blieb die blaue Farbe des DPI erhalten.

Als Kontrolle diente bei jedem Test ein Röhrchen, dem anstelle der Leukozidinprobe 0,02 ml Gelatine-Phosphat-Puffer zugegeben wurde.

3,263 Nachweis von PV-Leukozidin

PV-Leukozidin wurde mit der direkten mikroskopischen Methode (siehe bei 3,251) an menschlichen Granulozyten nachgewiesen. Zur Inaktivierung von Leukolysin wurde der zu testenden Probe Cholesterin in einer Endkonzentration von 0,25 mg/ml hinzugefügt. Die Reaktion war positiv, wenn an den Testzellen die Veränderungen eintraten, wie sie GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ beschrieben. Sie wurden hier mit "typisch" charakterisiert (Abb. 1).

3,264 Nachweis von NW-Leukozidin

NW-Leukozidin wurde mit Granulozyten des Kaninchens unter Anwendung der direkten mikroskopischen Methode nachgewiesen. Positiv war die Reaktion, wenn an den Granulozyten Veränderungen eintraten, wie sie von PROOM³³ beschrieben und hier mit "atypisch" bezeichnet wurden (Abb. 2).

3,265 Nachweis von Leukolysin

Leukolysin wurde mit Granulozyten des Menschen nachgewiesen, nachdem die zu testende Probe 30 Min. bei 60° C erhitzt wurde, um PV-Leukozidin zu inaktivieren. Als positive Reaktion wurde die vollständige Zerstörung (Lyse) der Granulozyten

angesehen, die mit der direkten mikroskopischen Methode festgestellt wurde (Abb. 3).

3,266 Bestimmung der Minimalen Leukoziden Dosis (MLeD)

Die MLeD (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³) wurde durch 2-fache Verdünnungen der zu testenden Probe in PPL bestimmt. Sie war in der höchsten Verdünnungsstufe enthalten, die gerade noch an a l l e n Zellen des Präparates die charakteristischen Veränderungen hervorrief, und wurde als reziproker Wert dieser Verdünnung angegeben.

Bei der indirekten Farbindikatormethode war die MLeD die Verdünnung der Probe, die gerade noch den Indikatorfarbstoff 2,6 Dichlorphenol-indophenol vollständig zur Leukobase reduzierte (reziproker Wert).

3,27 Nachweis der Hämolysine

3,271 Auf festem Medium

Zum Nachweis der Hämolysine von Staphylokokken auf festem Medium wurden die zu untersuchenden Stämme auf Blutagarplatten mit 10 %igem Zusatz von sterilem Schüttelblut 24 Std. bei 37° C bebrütet. Die erste Beurteilung wurde sofort nach der Inkubation vorgenommen. Die zweite Ablesung erfolgte nach 18-stündigem Aufenthalt bei 4° C im Kühlschrank.

Die α -Hämolysinbildung wurde auf Kaninchenblutagar, die β -Hämolyse auf Schafblutagar und die δ -Hämolyse auf Menschenblutagarplatten nachgewiesen. Bei der Beurteilung der β -Hämolyse war das Phänomen der "Hot-Cold-Lysis" (ELEK und LEVY⁹) ein wichtiges Kriterium.

Für den Nachweis der δ -Hämolyse wurde in zweifelhaften Fällen zusätzlich der CAMP-Test (MAASSEN und WULKOW²⁵) angewandt. Zu dem Zweck wurden die zu untersuchenden Stämme auf Blutagarplatten, die 5 % Schüttelblut vom Schaf enthielten, senkrecht zu einem stark β -hämolysierenden Staphylokokkenstamm aufgetragen. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C trat im positiven Fall eine Verstärkung der β -Hämolyse ein, die sich in einer totalen Aufhellung im Bereich der partiellen Hämolyse des β -Stammes zeigte.

3,272 In flüssigem Medium

Zum Nachweis der Hämolysine von Staphylokokken in flüssigem Medium wurden 1 %ige Erythrozytensuspensionen (vorher dreimal mit 0,14 M NaCl gewaschen) verwandt. Fünf Zehntel ml der zu testenden Probe wurden mit 0,5 ml Erythrozytensuspension gut gemischt und 1 Std. bei 37° C bebrütet. Die erste Ablesung der Reaktion geschah sofort nach der Bebrütung, die

zweite nach 18 Std. bei 4° C.

Der Nachweis von α -Hämolysin wurde mit Kaninchenerythrozyten, der von β -Hämolysin mit Schaf- und der von δ -Hämolysin mit Menschenerythrozyten vorgenommen. Bei der β -Hämolyse wurde besonders die "Hot-Cold-Lysis" berücksichtigt.

3,273 Bestimmung der Minimalen Hämolytischen Dosis (MHD)

Bei der Ermittlung der MHD wurde von der zu testenden Probe eine 2-fache Verdünnungsreihe in 0,14 M NaCl hergestellt. Zu 0,5 ml jeder Verdünnungsstufe kamen 0,5 ml Erythrozytensuspension hinzu. Die Weiterbehandlung erfolgte wie bei 3,272.

Eine MHD war in der höchsten Verdünnung enthalten, bei der eine vollständige Hämolyse auftrat (reziproker Wert).

3,28 Nachweis der Koagulase

Die Koagulasebildung von Staphylokokken wurde im Röhrchentest in Anlehnung an MEYER²⁶ nachgewiesen. Fünf Zehntel ml einer 24-Std. Staphylokokkenbouillonkultur wurden mit 0,5 ml einer Citrat-Plasma-Lösung vom Kaninchen (1 : 5 mit 0,14 M NaCl verdünnt) gemischt und 3 Std. bei 37° C bebrütet. Danach wurde die Reaktion erstmals abgelesen. Nach wei-

terem 18-stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur erfolgte eine nochmalige Ablesung. Als positive Reaktion galt eine vollständige Koagulation des Plasmas.

3,29 Nachweis der Mannitvergärung

Die Säurebildung bei der Mannitspaltung von Staphylokokken wurde auf Mannit-Bromthymolblau-Agar nachgewiesen. Die positive Reaktion wurde an der Gelbfärbung des Indikators nach 24-stündiger Bebrütung der Staphylokokkenkulturen bei 37° C erkannt.

4,0 Ergebnisse

4,1 Wahl der geeignetsten Methode zum Nachweis des leukoziden Effektes

Es wurden in der Literatur beschriebene Methoden zum Nachweis des leukoziden Effektes miteinander verglichen und auf ihre Brauchbarkeit für die Untersuchungen in dieser Arbeit geprüft. Dabei wurden solche Methoden, die bereits von der Beschreibung her als ungeeignet erschienen oder durch Modifikationen verbessert worden waren, nicht angewandt. Dazu gehörten die Methoden nach VAN DE VELDE³⁹, NEISER und WECHSBERG²⁷, JULIANELLE²¹ sowie PANTON und VALENTINE³⁰. Die Methoden nach JENSEN und MALOE¹⁹, JOHANOWSKY²⁰, GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ und WOODIN⁴⁰ wurden in vergleichenden Untersuchungen überprüft.

PV-Leukozidin enthaltende Kulturüberstände ($\bar{U}_1$, $\bar{U}_2$, $\bar{U}_3$) von 17 Std.-Bouillonkulturen des Staphylokokkenstammes V8 wurden mit den 4 verschiedenen Methoden auf ihre MLeD getestet. In der gleichen Weise wurde die MLeD von den leukoziden Konzentraten (K_1 , K_2 , K_3) ermittelt. Der Überstand $\bar{U}_1$ wurde in 5 parallel laufenden Tests auf die Reproduzierbarkeit der erzielten MLeD untersucht (Tab. 5).

Tabelle 4

Vergleich der MLeD-Werte von Kulturüberständen und Konzentraten des Staphylokokkenstammes V8 mit verschiedenen Methoden

Methode	MLeD ⁺					
	U ₁ ⁺⁺	U ₂	U ₃	K ₁ ⁺⁺⁺	K ₂	K ₃
JOHANOWSKY ²⁰	256	512	1024	4096	4096	2048
GLADSTONE und VAN HEYNINGEN ¹³	512	512	1024	4096	8192	8192
JENSEN und MALOE ¹⁹	256	128	512	2048	8192	4096
WOODIN ⁴⁰	256	256	512	2048	4096	4096

+ Minimale Leukozide Dosis

++ U₁, U₂, U₃ = Kulturüberstände 1, 2, 3

+++ K₁, K₂, K₃ = Konzentrate 1, 2, 3

Tabelle 5

Vergleich der mit verschiedenen Methoden ermittelten MLeD eines Kulturüberstandes des Staphylokokkenstammes V8 in 5 gleichartigen Tests

Methode	MLeD ⁺				
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5
JOHANOWSKY ²⁰	256	512	256	256	512
GLADSTONE und VAN HEYNINGEN ¹³	512	512	512	512	512
JENSEN und MALOE ¹⁹	256	128	512	1024	256
WOODIN ⁴⁰	256	256	128	512	256

+ Minimale Leukozide Dosis

Mit den beiden direkten mikroskopischen Methoden nach JOHANOWSKY²⁰ und nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ konnten etwa die gleichen Titer erzielt werden, während die Methoden nach JENSEN und MALOE¹⁹ und nach WOODIN⁴⁰ um etwa 1 Verdünnungsstufe niedrigere Titer ergaben (Tab. 4).

In 5 Wiederholungen des gleichen Tests lieferte lediglich die Methode nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ dasselbe Ergebnis (Tab. 5). Bei der Methode nach JOHANOWSKY²⁰ war ein Schwanken der MLeD um eine Verdünnungsstufe zu beobachten, während die WOODIN'sche Methode Schwankungen um 2 und die nach JENSEN und MALOE¹⁹ sogar um 3 Verdünnungsstufen aufwies.

Die beiden indirekten Methoden hatten den Vorteil, bequemer und schneller in der Ablesung der Testergebnisse durchführbar zu sein, während die mikroskopische Auswertung eines Testes bei der direkten Methode anstrengend und zeitraubend war. Dagegen war die Gewinnung von reinen Leukozyten oder Makrophagen aus dem Peritonealexsudat von Kaninchen für die indirekte Methode nicht immer erfolgreich, insbesondere, wenn das Exsudat verhältnismäßig viele Erythrozyten enthielt. Für eine täglich große Anzahl von MLeD-Bestimmungen über längere Zeit, wie sie in dieser Arbeit erforderlich waren,

war der Methode nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ der Vorzug zu geben. Die Leukozytengewinnung war mit dieser Methode am schnellsten und sichersten auszuführen. Darüber hinaus war die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse am größten. Für den Nachweis aller leukoziden Effekte, die an Granulozyten des Menschen zu erzielen waren, wurde die direkte mikroskopische Methode nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ am geeignetsten gefunden.

4,2 Ermittlung einiger Kulturbedingungen zur Erreichung eines optimalen Leukozidintiters in Staphylokokkenbouillonkulturen

Für diese Untersuchungen war es wichtig zu wissen, nach welcher Inkubationszeit und in welchem Nährmedium bei Staphylokokkenbouillonkulturen die höchste Leukozidinkonzentration zu erwarten war. Zunächst wurde der Staphylokokkenstamm V8 gleichzeitig in 8 verschiedenen Nährmedien unter gleichen Bedingungen bebrütet. Die Kulturgefäße enthielten jeweils 100 ml Kultur. Als Kontrolle wurde jedes Medium unbeimpft in gleicher Weise behandelt. Während der ersten 24 Std. erfolgte stündlich eine Probeentnahme (1 ml) aus allen 8 Kulturen und den Kontrollen. Anschließend wurden alle 24 Std. und jeweils 10 Std. danach Proben entnommen. Die Inkubationsdauer betrug 6 Tage. Die Proben dienten zur MLeD-Bestimmung mit der direkten mikroskopischen Methode. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse wurden alle Kulturen und Kontrollen doppelt angesetzt und getestet.

Die geprüften Nährmedien waren die 6 L-Medien, BB und TSB. Ihre Auswahl erfolgte nach verschiedenen Gesichtspunkten: Einmal sollten einige im hiesigen Institut verwendete Nährmedien auf ihre Brauchbarkeit zur PV-Leukozidinbildung geprüft werden (BB, TSB). Zum anderen wurden an dem von GLAD-

STONE und VAN HEYNINGEN¹³ empfohlenen L-Medium Modifikationen vorgenommen.

WOODIN⁴⁰ hatte bei seinen Untersuchungen über die PV-Leukozidinbildung von V8 darauf hingewiesen, daß hohe Konzentrationen von Hefeextrakt im L-Medium eine Hemmung der Leukozidinbildung verursachten. Weiter stellte WOODIN⁴⁷ bei der Verwendung von Oxoid-Hefeextrakt statt Difco-Hefeextrakt eine 20-fache Steigerung der Leukozidinproduktion fest. Darum wurden für diesen Versuch 3 unterschiedliche Konzentrationen von Hefeextrakt bei der Herstellung des L-Mediums verwendet, und zwar jeweils mit Hefeextrakt von der Firma Merck ("L-M"-Medien) und mit Hefeextrakt von der Firma Oxoid ("L-O"-Medien). Die Medien wurden entsprechend ihren Konzentrationen mit L-O₁, L-O₂, L-O₃ sowie L-M₁, L-M₂, L-M₃ gekennzeichnet. Dabei enthielten L-M₁ und L-O₁ die höchste Konzentration an Hefeextrakt, nämlich etwa 6 %⁽¹⁾. L-O₂ und L-M₂ enthielten etwa 3 %⁽¹⁾ (das entsprach der Konzentration, die GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ vorschlugen), und L-O₃ und L-M₃ enthielten etwa 1 %⁽¹⁾ Hefeextrakt.

(1) Hierbei ist zu beachten, daß sich die Prozentangaben darauf beziehen, wieviel Hefeextrakt zur Herstellung des Nährmediums verwandt wurde (g Hefeextrakt/ml Medium). Der wirkliche Anteil an Hefesubstanzen im fertigen Medium ist wegen des Verlustes bei der Dialyse geringer.

In den Abb. 4 - 9 wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Dabei wurden die MLeD logarithmisch gegen die Bebrütungszeit aufgetragen. Es fiel zunächst auf, daß in allen Medien die PV-Leukozidinkonzentrationen in den ersten Std. der Bebrütung bis zur Erreichung des Maximums steil anstiegen und dann allmählich abfielen. Die Maxima waren mit einer Ausnahme in allen 8 Medien innerhalb der ersten 24 Std. der Inkubation zu finden, mit der Ausnahme von TSB. Dort fand sich das Maximum nach 34 Std. Inkubation (Abb. 7).

Beim Vergleich der L-Medien untereinander ergab sich ein deutlicher Unterschied der PV-Leukozidinkonzentrationen in Abhängigkeit von dem verwendeten Hefeextrakt (Abb. 6). Die L-O-Medien (Abb. 4) zeigten in allen 3 verwendeten Konzentrationen höhere MLeD als die L-M-Medien (Abb. 5).

Der Einfluß der Konzentration des verwendeten Hefeextraktes im L-Medium auf die Leukozidinkonzentration ist aus den Abb. 4 und 5 zu ersehen. In der Konzentrationsstufe 1 (L-O₁ und L-M₁) wurden die niedrigsten MLeD erreicht, während mit der Konzentrationsstufe 3 (L-O₃ und L-M₃) die höchsten MLeD erzielt werden konnten.

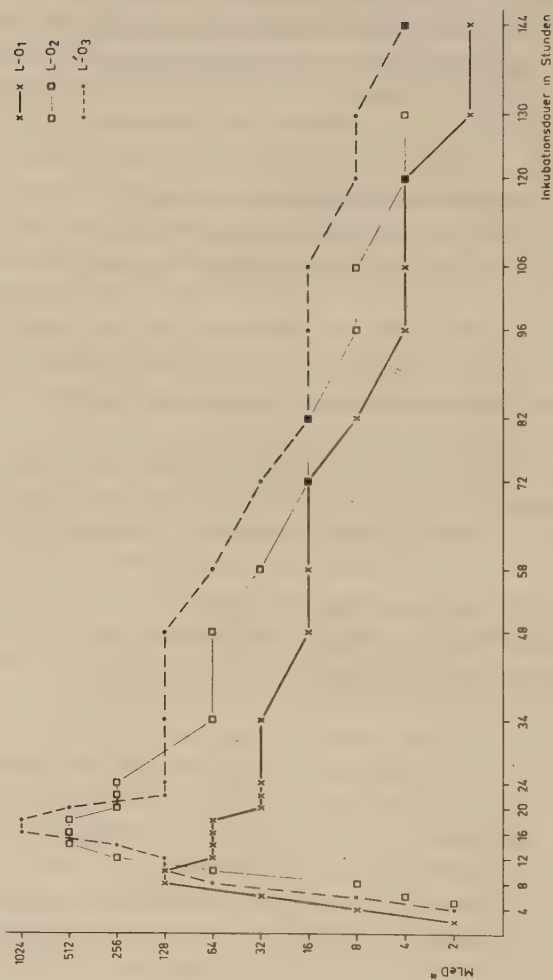
Im Vergleich zu den L-Medien ergaben BB und TSB nur niedrige Leukozidinkonzentrationen. Die maximalen Werte lagen für BB bei 64 und für TSB bei 16 MLeD.

Von den untersuchten Medien erwies sich für die PV-Leukozidinproduktion das L-O₃-Medium als das beste. Die optimale Inkubationszeit lag hier zwischen 15 und 20 Std. (Abb. 4).

In einem weiteren Versuch wurde an anderen PV-leukozidin-positiven Staphylokokkenkulturen (M₄, R₂₂, H₁) auch vom Tier (R₂₂ vom Rind, H₁ vom Hund) diese optimale Inkubationsdauer für das L-O₃-Medium bestätigt (Abb. 9).

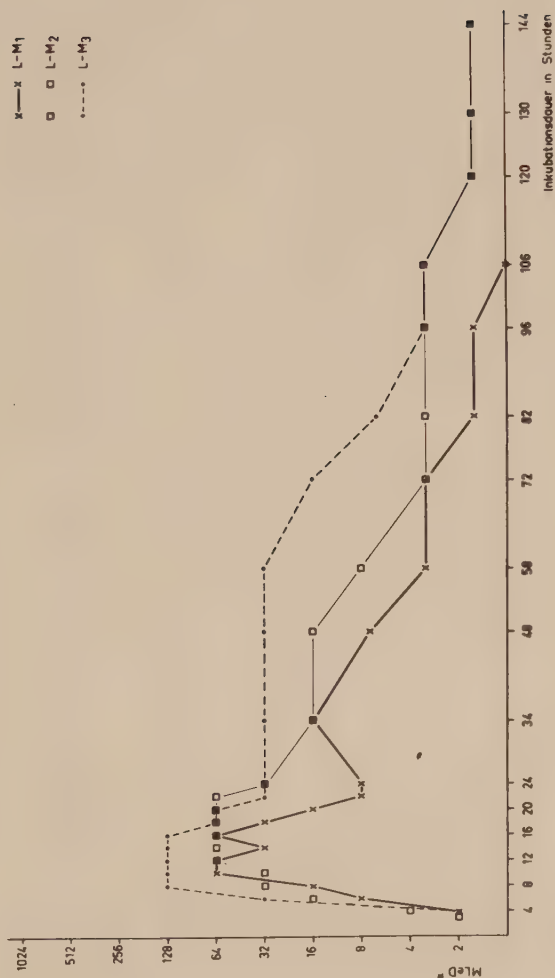
Für die weiteren Versuche wurde ausschließlich das L-O₃-Medium verwendet. Die Inkubationszeit wurde auf 17 Std. festgelegt.

Abb 4: PV-Leukoizinbildung des Staphylokokkenstammes V₈ in den L-O-Medien



■ Minimale Leukoide Dosis

Abb. 5: PV-Leukozytobildung des Staphylokokkenstammes V₆ in den L-M-Medien



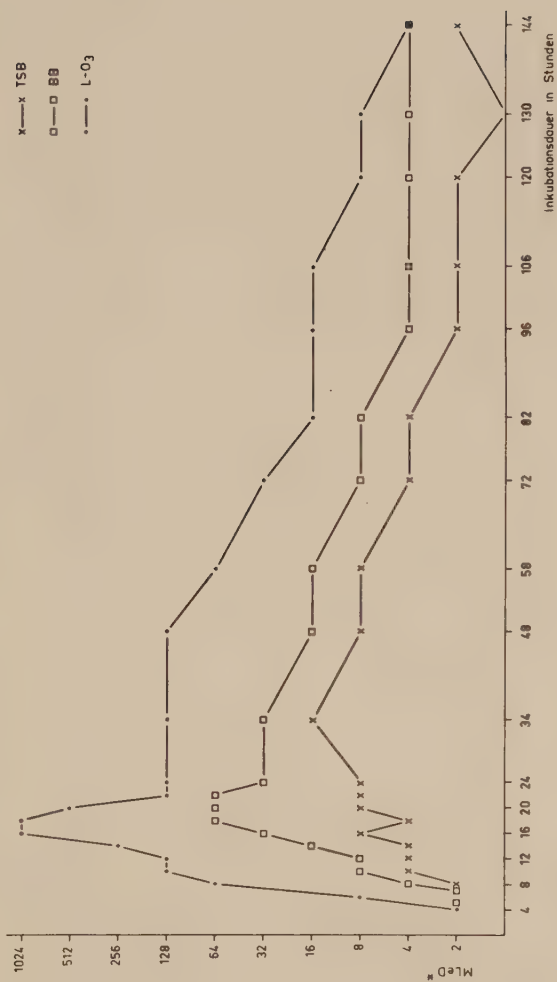
* Minimale Leukozyte Dosis

Abb. 6: PV - Leukozidinbildung des Staphylokokkenstammes Vg im L-O₃-Medium und L-M₃-Medium



* Minimale Leukozide Dosis

Abb 7: PV-Leukoizinbildung des Staphylokokkenstammes V₉ in Trypticase-Soy-Broth (TSB),
Brucella-Broth (BB) und im L-O₃-Medium



* Minimale Leukoizide Dosis

Abb. 8: PV-Leukozydinbildung im L-O₃-Medium

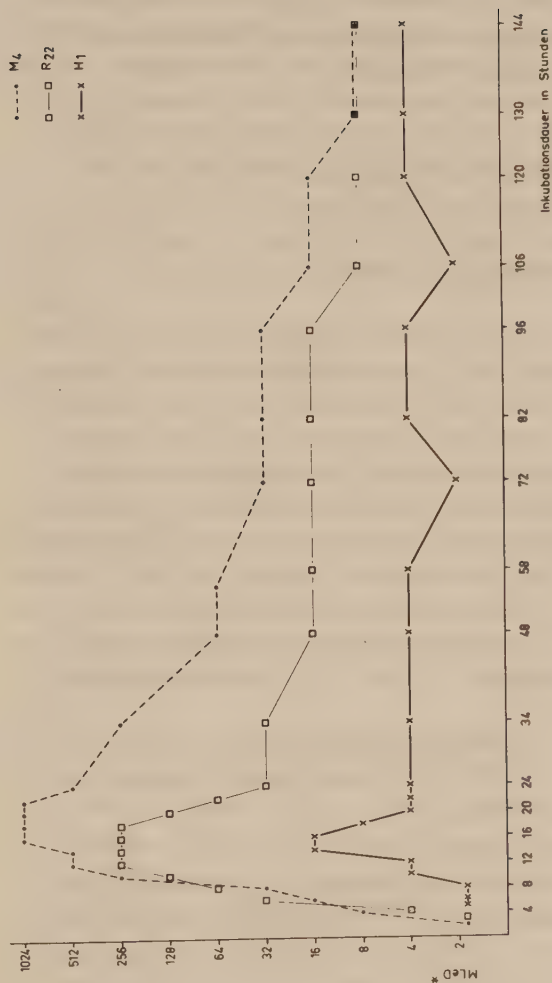
Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am Beispiel von 2 Kulturen des *Staphylococcus aureus* V₉



* Minimale Leukozyde Dosis

Abb. 9: PV - Leukozydinbildung einer Staphylokokkenkultur vom Menschen (M_1), Rind (R_{22}) und Hund (H_1)

im L-O₂-Medium



* Minimale Leukozyde Dosis

4,3 Versuche zur Verbesserung der Methode zum Nachweis des leukoziden Effektes

Es wurde versucht, durch Verwendung anderer Testzellen die Nachweismethode für Leukozidin zu verbessern. Zu dem Zweck wurden Myxamöben und die Granulozyten einiger Tierarten auf ihre morphologischen Veränderungen gegenüber PV-Leukozidin, NW-Leukozidin und Leukolysin geprüft.

4,31 Myxamöben als Testzellen

Die Myxamöben "Dictyostelium discoideum" wurden als Suspension von Einzelzellen mit der direkten mikroskopischen Methode und der Farbindikatormethode auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den leukoziden Substanzen getestet. Dabei wurde in der gleichen Weise wie mit Granulozyten oder Makrophagen verfahren mit der Ausnahme, daß nicht bei 37° C bebrütet wurde, sondern bei 22° C, der für das Wachstum von Dictyostelium discoideum optimalen Wachstumstemperatur.

Die Tests wurden darüber hinaus in 1/60 M SÖRENSEN Phosphatpuffer von pH 6,0 vorgenommen. Die Amöben wurden den leukoziden Substanzen maximal bis 8 Std. ausgesetzt. Als Kontrolle diente eine Amöbensuspension in 1/60 M SÖRENSEN Phosphatpuffer.

Gegenüber allen 3 leukoziden Substanzen konnte keinerlei Veränderung der morphologischen Struktur, der amöboiden Beweglichkeit, der Phagozytosefähigkeit oder der Fähigkeit zur Reduktion des Farbstoffes 2,6-Dichlor-phenol-indophenol festgestellt werden.

Dictyostelium discoideum wurde durch PV-Leukozidin, NW-Leukozidin und Leukolysin nicht beeinträchtigt und war daher zum Nachweis dieser leukoziden Effekte nicht geeignet.

4,32 Granulozyten verschiedener Tierarten als Testzellen

Es wurden Granulozyten verschiedener Tierarten (Rind, Hund, Kaninchen, Pferd, Schwein, Schaf, Meerschweinchen und Maus) gewonnen. Die isolierten Granulozyten wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber PV-Leukozidin, NW-Leukozidin und Leukolysin getestet.

4,321 Isolierung lebender Granulozyten von verschiedenen Tierarten

Zur Isolierung der Granulozyten kamen 3 Methoden zur Anwendung: Die Objektträgeradhäsion, die Isolierung nach Hämolyse der Erythrozyten mit anschließender Objektträgeradhäsion und

die Isolierung aus der Leukozytenschicht des sedimentierten Blutes ("buffy coat") mit anschließender Objektträgeradhäsion.

4,3211 Objektträgeradhäsion

Mit Hilfe der Objektträgeradhäsion konnten die Granulozyten des Kaninchens, des Meerschweinchens und der Maus isoliert werden. Jedoch war diese Methode bei jeweils 5 untersuchten Individuen nur bei der Maus regelmäßig erfolgreich. Beim Kaninchen und beim Meerschweinchen gab es individuelle Unterschiede insofern, als bei einigen Tieren die Haftfestigkeit des gewonnenen Blutropfens am Objektträger so groß war, daß ein Abspülen des Koagulum von der Glasoberfläche nicht mehr möglich war, ohne gleichzeitig die Granulozyten ebenfalls zu entfernen.

Bei den übrigen Tieren waren keine oder nicht genügend Granulozyten an dem Objektträger haften geblieben. Durch Veränderung der Bebrütungszeiten war ebenfalls kein besserer Erfolg zu erzielen.

Beim Kaninchen konnte ein sicheres Haften der Granulozyten auch durch Auftropfen von Bauchhöhlenexsudat auf den Objektträger erreicht werden.

4,3212 Isolierung nach Hämolyse mit anschließender Objektträgeradhäsion

Da mit der Methode von BEHRENS und ESCH⁵ lebende Rinderleukozyten leicht zu gewinnen sein sollten, wurde versucht, diese Methode zur Isolierung von weißen Blutzellen anderer Tiere zu benutzen. Diese Methode wurde in Kombination mit der Objektträgeradhäsion der Granulozyten erprobt. Die Gewinnung von Leukozyten aus dem Blut des Rindes, Schafes, Pferdes und Hundes war erfolgreich. Beim Schwein und Kaninchen konnten die Erythrozyten nicht zur Hämolyse gebracht werden, ohne gleichzeitig auch die Leukozyten zu zerstören.

Die auf diese Weise gewonnenen Leukozyten waren nicht völlig frei von Erythrozyten. Mit Hilfe der Objektträgeradhäsion war es jedoch möglich, Erythrozyten und Lymphozyten zu entfernen.

Somit konnten mit dieser kombinierten Methode Granulozyten vom Rind, Schaf, Pferd und Hund isoliert werden.

4,3213 Isolierung aus der Leukozytenschicht
("buffy coat") mit anschließender Ob-
jektträgeradhäsion

Die Isolierung von Leukozyten aus der Leukozytenschicht zentrifugierten Citratblutes war mit der angewandten Technik bei allen Tieren möglich, jedoch konnte die Entfernung der Erythrozyten mit dieser Methode nicht vollständig erreicht werden. Das gelang durch die Objektträgeradhäsion. Auf diese Weise wurden Granulozyten vom Rind, Schaf, Pferd, Schwein, Hund und Kaninchen isoliert.

4,322 Wirkung der leukoziden Substanzen auf Granulozyten und Erythrozyten verschiedener Tierarten

Es wurden Granulozyten und Erythrozyten vom Menschen, Rind, Hund, Kaninchen, Pferd, Schwein, Schaf, Meerschweinchen und Granulozyten von der Maus vergleichend auf ihre morphologischen Veränderungen nach der Einwirkung von PV-Leukozidin, NW-Leukozidin und Leukolysin untersucht.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse wurden alle 3 Toxine parallel mit den Zellen von 3 verschiedenen Individuen jeder Art getestet.

Bei den morphologischen Veränderungen der untersuchten Granulozyten wurden 3 Typen unterschieden: "Typisch", "atypisch" und "Lyse". Mit "typisch" wurden alle diejenigen Zellveränderungen bezeichnet, die das charakteristische Bild zeigten, das durch Leukozidin vom PANTON-VALENTINE-Typ an Granulozyten vom Menschen hervorgerufen und von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ ausführlich beschrieben wurde (siehe 2,61 und Abb. 1). Als Lyse wurde die vollständige Zerstörung der Zellstruktur angesehen, wie sie bei der Einwirkung von Leukolysin auf menschliche Granulozyten zu beobachten war und ebenfalls von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ beschrieben wurde (siehe 2,61 und Abb. 3). Alle übrigen Zellveränderungen morphologischer Art, die nicht "typisch" oder Lyse waren, aber deutlich von dem Aussehen der amöboid beweglichen lebenden Zellen abwichen, wurden mit "atypisch" klassifiziert. Sie wurden dem Leukozidin vom NEISSER-WECHSBERG-Typ beigegeben und von VALENTINE³⁷ und PROOM³³ charakterisiert (siehe 2,61 und Abb. 2).

Bei der Beurteilung der Hämolyse gab es nur den Typ: Lyse. Damit war die vollständige Lyse der Erythrozyten gemeint.

4,3221 PV-Leukozidin

Da das verwendete PV-Leukozidin auch α -Hämolysinaktivität besaß, mußte bei der Beurteilung der Ergebnisse damit gerechnet werden, daß diese durch α -Hämolysin beeinflusst oder sogar zum Teil verursacht worden waren. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen sind die Ergebnisse aus der Tab. 6 zu beurteilen. Das PV-Leukozidin verursachte "typische" Veränderungen in eindeutiger Weise lediglich an Granulozyten des Menschen, des Kaninchens und der Maus. Die Granulozyten der übrigen Tiere wurden ausschließlich "atypisch" oder durch Lyse und nur in niedrigen Titern verändert.

Demzufolge eigneten sich als Testzellen zum Nachweis des PV-Leukozidins lediglich die Granulozyten vom Menschen, Kaninchen und der Maus. Die Empfindlichkeit der Mäusegranulozyten erwies sich jedoch bedeutend geringer als die der Granulozyten des Menschen (um das 16- bis 128-fache) und die der Granulozyten des Kaninchens (um das 64- bis 1024-fache).

Die Untersuchung an Erythrozyten sollte zeigen, ob PV-Leukozidin hämolytische Eigenschaften besitzt. Nach den

bisherigen Erkenntnissen galt es als nichthämolytisch. Wegen der Anwesenheit von α -Hämolysin in dem verwendeten Toxin, wenn auch in relativ niedriger Konzentration, konnten nur hohe, der MLeD parallel laufende hämolytische Titer ursächlich mit PV-Leukozidin in Zusammenhang gebracht werden. Wie aus Tab. 6 zu ersehen ist, war das nicht der Fall. Ein hämolytischer Effekt von PV-Leukozidin auf die hier untersuchten Erythrozyten war also nicht festzustellen.

4,3222 NW-Leukozidin

Das durch PV-Leukozidin mit 4 MLeD verunreinigte NW-leukozidin-aktive Präparat mußte gleichfalls mit der Einschränkung beurteilt werden, daß bei seiner Wirkung auf die Testzellen eine Überlagerung beider Effekte zur Verschleierung der Ergebnisse führen könnte, wenngleich auch die durch NW-Leukozidin verursachten Veränderungen an den Granulozyten vom Kaninchen meist "atypischer" Art waren und daher von den durch PV-Leukozidin verursachten "typischen" Veränderungen unterschieden werden konnten (VALENTINE³⁷, PROOM³³). "Atypische" Zellveränderungen konnten an den Granulozyten vom Rind, Hund,

Kaninchen, Pferd, Schwein, Schaf, Meerschweinchen und der Maus gefunden werden (Tab. 7). Bei den Zellen vom Menschen, der Maus und dem Kaninchen waren aber auch gleichzeitig "typische" Bilder zu sehen, die als PV-Leukozidinwirkung zu deuten waren. Die "atypischen" Veränderungen wurden vermutlich durch das NW-Leukozidin verursacht. Demzufolge war auch die größte Empfindlichkeit bei den Granulozyten vom Kaninchen jeweils mit 128, 64 und 64 MLeD zu finden. Es folgen in der Empfindlichkeit die Granulozyten vom Schwein (8, 32, 8 MLeD), Schaf (8, 8, 4 MLeD), Hund (4, 16, 4 MLeD), Maus (4, 8, 4 MLeD), Meerschweinchen (2, 2, 8 MLeD) und vom Pferd (-, 2, 4 MLeD).

Bezeichnend für die Titration des NW-Leukozidins war die Tatsache, daß selbst in den stärksten Konzentrationen selten alle Leukozyten eines Präparates verändert waren. Bei den Schweine- und Meerschweinchengranulozyten waren zugleich auch Lyseerscheinungen zu beobachten. Die mit den verschiedenen Erythrozyten gegenüber NW-Leukozidin gemessenen MHD entsprachen mit nur wenigen Ausnahmen in ihrer Höhe den MLeD, die mit den Granulozyten derselben Tierart ermittelt wurden (Tab. 7). Es wur-

de demnach eine weitgehende Übereinstimmung der Titer von NW-Leukozidin und α -Hämolysin festgestellt.

4,3223 Leukolysin

Bei dem verwendeten leukolysin-positiven Präparat war die Wirkung des gleichzeitig vorhandenen β -Hämolysins ein störender Faktor. Das wurde mit Schaf- und Rinderzellen deutlich, bei denen eine höhere Empfindlichkeit der Erythrozyten als der Granulozyten festzustellen war (Tab. 8). Die für das Leukolysin typische Lyse der Granulozyten zeigte sich bei den Zellen aller untersuchten Tierarten. Allerdings war diese Lyse mit Ausnahme der Meerschweinchen-, Hunde-, Rinder- und Menschengranulozyten mit "atypischen" Zellveränderungen kombiniert. Ob sie bei diesen Granulozyten für die Wirkung von Leukolysin charakteristisch, ob noch Spuren von α -Hämolysin wirksam oder ein anderer unbekannter Effekt die Ursache waren, ging aus diesen Untersuchungen nicht eindeutig hervor. Die größte Empfindlichkeit zeigten Kaninchengranulozyten jeweils mit 32, 32 und 16 MLeD. Es folgten die Granulozyten des Menschen (16, 8, 16 MLeD), des Meerschweinchens (4, 8, 8 MLeD), des Rindes (16, 4, 4 MLeD), der Maus

(8, 4, 4 MLeD), des Pferdes (2, 2, 2 MLeD), des Hundes (-, 2, 2 MLeD), des Schweines (2, 2, - MLeD) und des Schafes (2, -, 2 MLeD).

Tabelle 6

Zellschädigende Wirkung eines PV-leukozidin-positiven Toxins auf die Leukozyten und Erythrozyten des Menschen und verschiedener Tiere

Herkunft der Test- zellen	Wirkung auf die Testzellen (MLeD ⁺⁺ , MHD ⁺⁺)						
	Art d.Zell- schädigung	Tier 1		Tier 2		Tier 3	
		Leuk.	Ery.	Leuk.	Ery.	Leuk.	Ery.
Mensch	typisch	8192		8192		8192	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	-	-	-	-	-	-
Rind	typisch	-		-		-	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	2 ⁺	4	2 ⁺	8	2 ⁺	4
Hund	typisch	-		-		+++	
	atypisch	-		-		+++	
	Lyse	-	4	2 ⁺		+++	+++
Kaninch.	typisch	32768		16384		65532	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	-	64	-	32	-	128
Pferd	typisch	4		-		4	
	atypisch	8 ⁺		-		4 ⁺	
	Lyse	-	2	-	-	-	-
Schwein	typisch	-		-		-	
	atypisch	32 ⁺		2 ⁺		128 ⁺	
	Lyse	32 ⁺	8	2 ⁺	2	64 ⁺	8
Schaf	typisch	16		8 ⁺		2	
	atypisch	32 ⁺		4 ⁺		-	
	Lyse	-	8	-	4	-	2
Meerschw.	typisch	16 ⁺		32 ⁺		-	
	atypisch	4 ⁺		8 ⁺		-	
	Lyse	4	4	4	8	-	16
Maus	typisch	128		64		512	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	4 ⁺	+++	2 ⁺	+++	4 ⁺	+++

+ nicht alle Zellen zeigten diese Schädigung

++ MLeD = Minimale Leukozide Dosis

MHD = Minimale Hämolytische Dosis

+++ nicht untersucht

Tabelle 7

Zellschädigende Wirkung eines NW-leukozidin-positiven Toxins auf die Leukozyten und Erythrozyten des Menschen und verschiedener Tiere

Herkunft der Test- zellen	Wirkung auf die Testzellen (MLeD ⁺⁺ , MHD ⁺⁺)						
	Art d.Zell- schädigung	Tier 1		Tier 2		Tier 3	
		Leuk.	Ery.	Leuk.	Ery.	Leuk.	Ery.
Mensch	typisch	4		2		2	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	-	-	-	-	-	-
Rind	typisch	-		-		-	
	atypisch	4		8		4	
	Lyse	-	-	-	4	-	2
Hund	typisch	-		-		+++	
	atypisch	4		16		+++	
	Lyse	-	2	-	-	+++	+++
Kaninch.	typisch	16		8		8	
	atypisch	128		64 ⁺		128 ⁺	
	Lyse	-	128	-	64	-	64
Pferd	typisch	-		-		-	
	atypisch	2		2 ⁺		4 ⁺	
	Lyse	-	2	-	2	-	2
Schwein	typisch	-		-		-	
	atypisch	8 ⁺		32 ⁺		8 ⁺	
	Lyse	2 ⁺	4	4 ⁺	8	4 ⁺	4
Schaf	typisch	-		2 ⁺		-	
	atypisch	8 ⁺		8 ⁺		4 ⁺	
	Lyse	-	4	-	16	-	8
Meerschw.	typisch	-		-		-	
	atypisch	2 ⁺		2 ⁺		8 ⁺	
	Lyse	2 ⁺	4	-	2	2 ⁺	4
Maus	typisch	8 ⁺		2		2	
	atypisch	4 ⁺		8 ⁺		4	
	Lyse	-	+++	-	+++	-	+++

+ nicht alle Zellen zeigten diese Schädigung

++ MLeD = Minimale Leukozide Dosis

MHD = Minimale Hämolytische Dosis

+++ nicht untersucht

Tabelle 8

Zellschädigende Wirkung eines leukolysin-positiven Toxins
auf die Leukozyten und Erythrozyten des Menschen und
verschiedener Tiere

Herkunft der Test- zellen	Wirkung auf die Testzellen (MLeD ⁺⁺ , MHD ⁺⁺)						
	Art d.Zell- schädigung	Tier 1		Tier 2		Tier 3	
		Leuk.	Ery.	Leuk.	Ery.	Leuk.	Ery.
Mensch	typisch	-		-		-	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	16	32	8	16	16	16
Rind	typisch	-		-		-	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	16	64	4	16	4	32
Hund	typisch	-		-		+++	
	atypisch	-		-		+++	
	Lyse	2	2	-	2	+++	+++
Kaninch.	typisch	-		-		-	
	atypisch	-		32 ⁺		-	
	Lyse	32	16	32	32	16	16
Pferd	typisch	-		-		-	
	atypisch	8 ⁺		8 ⁺		4 ⁺	
	Lyse	2	2	2	4	2	2
Schwein	typisch	-		-		-	
	atypisch	2 ⁺		-		2 ⁺	
	Lyse	2 ⁺	8	2	4	-	4
Schaf	typisch	-		-		-	
	atypisch	2 ⁺		-		4 ⁺	
	Lyse	2 ⁺	64	-	64	2 ⁺	32
Meerschw.	typisch	-		-		-	
	atypisch	-		-		-	
	Lyse	4	4	8	2	8	2
Maus	typisch	-		-		-	
	atypisch	-		16 ⁺		8 ⁺	
	Lyse	8	+++	4	+++	4	+++

+ nicht alle Zellen zeigten diese Schädigung

++ MLeD = Minimale Leukozyde Dosis

MHD = Minimale Hämolytische Dosis

+++ nicht untersucht

4,4 Häufigkeit der Leukozidinbildung bei Staphylokokken verschiedener Herkunft

Es wurden insgesamt 240 Staphylokokkenkulturen auf die Bildung von PV-Leukozidin, NW-Leukozidin und Leukolysin in Bouillon nach einer Bebrütung bei 37° C (17 Std.) untersucht. Von den 240 Stämmen waren 40 koagulase-negativ und die übrigen 200 koagulase- und mannit-positiv. Einhundertundzwanzig Kulturen stammten vom Rind, 52 vom Hund und 68 vom Menschen. Die von jeder Staphylokokkenkultur gewonnenen Überstände wurden jeweils in 2 Portionen geteilt. Die eine davon wurde bei 60° C erhitzt, um das PV-Leukozidin zu inaktivieren. Diese Probe diente zum Nachweis von Leukolysin. Die andere Portion wurde erneut halbiert. Die erste Hälfte wurde sofort auf das Vorkommen jeglicher leukozider Aktivität untersucht, während die zweite Hälfte zur Inaktivierung von Leukolysin mit Cholesterin behandelt wurde. Alle Proben wurden mit Granulozyten vom Menschen und Kaninchen getestet, um PV- und NW-Leukozidin differenzieren zu können. In allen Fällen wurde die MLeD ermittelt.

4,41 PV-Leukozidin

Von insgesamt 50 S. aureus-Kulturen vom Menschen waren 34 %, von 100 Kulturen vom Rind 22 % PV-leukozidin-positiv. Der größte prozentuale Anteil PV-leukozidin-

positiver Kulturen ergab sich mit 38 % bei den 50 Kulturen vom Hund (Tab. 9). Die höchsten PV-Leukozidinkonzentrationen wurden bei den Kulturen vom Menschen gemessen (Tab. 11).

Das PV-Leukozidin wurde demnach am häufigsten bei Staphylokokken vom Hund und am seltensten bei Staphylokokken vom Rind nachgewiesen.

Bei den 40 koagulase-negativen Staphylokokkenkulturen konnte kein PV-Leukozidin nachgewiesen werden (Tab. 10).

4,42 NW-Leukozidin

Die exakte Feststellung von NW-Leukozidin war nicht möglich, wenn die Wirkung dieses Toxins auf Kaninchengranulozyten durch die gleichzeitige leukozide Einwirkung von PV-Leukozidin überlagert war (Tab. 9). Die ermittelten Zahlen für das Vorkommen von NW-Leukozidin sind daher vergleichend nicht auswertbar.

Bei den koagulase-negativen Stämmen (Tab. 10) war die NW-Leukozidinaktivität durch PV-Leukozidin nicht gestört, so daß hier die ermittelten Zahlen das wirkliche Vorkommen anzeigten. Achtundzwanzig % der 18 koagulase-negativen Kulturen vom Menschen waren NW-leukozidin-positiv. Bei den Rinder-

stämmen erwiesen sich 35 % und bei den Hundestämmen von nur 2 untersuchten keiner als NW-leukozidin-positiv.

4,43 Leukolysin

Leukolysin wurde von S. aureus (Tab. 9) häufiger gebildet als das PV-Leukozidin. Von den 50 Kulturen vom Menschen waren 52 % und von 50 Kulturen vom Hund ebenfalls 52 % leukolysin-positiv. Von den 100 Kulturen vom Rind wiesen 54 % Leukolysinaktivität auf.

Bemerkenswert war die Verteilung der Titerhöhen des Leukolysins. Mit der Ausnahme von nur 3 Fällen wurden bei allen übrigen MLeD-Titrationsen sehr niedrige Werte gemessen, niemals mehr als 16 MLeD. Auffallend war auch die Schärfe des Endpunktes (MLeD) bei den Leukolysin-Titrationsen. Sie stand im Gegensatz zu den Erfahrungen bei den PV-Leukozidin- und besonders NW-Leukozidin-Titrationsen, bei denen der Endpunkt häufig nicht klar bestimmbar war. Nicht selten gab es dabei die Fälle, bei denen über den definierten Endpunkt hinaus noch in 3 - 4 Verdünnungsstufen leukozide Wirkungen an einigen Testzellen zu beobachten waren.

Bei den koagulase-negativen Staphylokokken (Tab. 10) wurde ebenfalls Leukolysin festgestellt: 17 % der Kulturen vom Menschen

und 40 % der vom Rind waren leukolysin-positiv. Bei den beiden Kulturen vom Hund war kein Leukolysin nachzuweisen.

Tabelle 9

Vorkommen leukozider Substanzen bei S. aureus-Kulturen vom Menschen, Rind und Hund

Kulturen		Zahl der positiven Kulturen		
Herkunft	Gesamt- zahl	PV-Leukozidin	NW-Leukozidin	Leukolysin
Mensch	50	17 = 34 %	15 ⁺ = 30 %	26 = 52 %
Rind	100	22 = 22 %	41 ⁺ = 41 %	54 = 54 %
Hund	50	19 = 38 %	3 ⁺ = 36 %	26 = 52 %

⁺Die eindeutige Bestimmung von NW-Leukozidin war nicht immer mit Sicherheit möglich, so daß die wahre Zahl wahrscheinlich höher liegt.

Tabelle 10

Vorkommen leukozider Substanzen bei koagulase-negativen Staphylokokkenkulturen vom Menschen, Rind und Hund

Kulturen		Zahl der positiven Kulturen		
Herkunft	Gesamtzahl	PV-Leukozydin	NW-Leukozydin	Leukolysin
Mensch	18	-	5 = 28 %	3 = 17 %
Rind	20	-	7 = 35 %	8 = 40 %
Hund	2	-	-	-

Tabelle 11

Verteilung der Konzentrationen (MLeD⁺⁺⁺⁺) leukoider Substanzen bei S. aureus-Kulturen vom Menschen, Rind und Hund

Herkunft der Kulturen	Art der Leukoiziden Substanz	Anzahl der positiven Kulturen	Anzahl der Kulturen mit verschiedenen Konzentrationen (MLeD)				
			sehr niedrig MLeD: bis 4	niedrig MLeD: 8 - 16	mittel MLeD: 32 - 64	hoch MLeD: 128 - 256	sehr hoch MLeD: 512 u. höher
Mensch	PV ⁺	17 = 100%	2 = 11,76%	4 = 23,52%	7 = 41,20%	2 = 11,76%	2 = 11,76%
	NW ⁺⁺	15 = 100%	4 = 26,66%	5 = 33,35%	4 = 26,66%	-	2 = 13,33%
	Ly ⁺⁺⁺	26 = 100%	24 = 92,31%	2 = 7,69%	-	-	-
Rind	PV	22 = 100%	9 = 40,90%	9 = 40,90%	3 = 13,65%	1 = 4,55%	-
	NW	41 = 100%	7 = 17,32%	21 = 51,22%	12 = 29,26%	1 = 1,99%	-
	Ly	54 = 100%	53 = 98,15%	1 = 1,85%	-	-	-
Hund	PV	19 = 100%	12 = 63,16%	7 = 36,84%	-	-	-
	NW	3 = 100%	-	3 = 100 %	-	-	-
	Ly	26 = 100%	26 = 100 %	-	-	-	-

+ PV-Leukoizidin

++ NW-Leukoizidin

+++ Leukolysin

++++ Minimale Leukoizide Dosis

4,5 Wirkung leukozider Substanzen von Staphylokokkenkulturen vom Menschen, Rind und Hund auf die Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund

Die Kulturüberstände von 100 Kulturen vom Rind und jeweils 50 Kulturen vom Menschen und Hund wurden parallel mit Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund auf ihre MLeD getestet. Dabei wurde die mikroskopische Methode angewandt. Der leukozide Effekt wurde mit "typisch" oder "Lyse" beurteilt (siehe bei 4,322).

Die Kulturen vom Menschen zeigten "typische", d.h. für PV-Leukozidin charakteristische Wirkungen nur an Granulozyten vom Menschen (34 %), Lyse an Granulozyten aller 3 Tierarten (Tab. 12). Ähnlich war die Wirkung der Rinderstaphylokokken. Ein "typischer" Effekt war nur an Granulozyten vom Menschen (22 %), Lyse dagegen an allen Granulozytenarten zu beobachten.

Anders war die Wirkung der Hundestaphylokokken. Sie vermochten neben den Granulozyten des Menschen (38 %) auch die des Hundes (54 %) "typisch" zu schädigen. Lyse verursachten sie bei allen 3 Granulozytenarten. Darüber hinaus wurde mit Staphylokokken vom Hund in 53 % der Fälle eine höhere MLeD mit Hundegranulozyten als mit Granulozyten vom Menschen gemessen. Die MLeD war meistens um das Zwei- bis Vierfache, im Extremfall

(Stamm H 41, Tab. 15) sogar um das 32-fache höher. In einigen Ausnahmen fiel die MLeD der Kulturüberstände von Hundestaphylokokken mit menschlichen Granulozyten höher aus als mit Hundegranulozyten (16 %).

Bei den Staphylokokkenkulturen, die Lyse der Granulozyten verursachten, konnten keine bedeutenden herkunftsmäßigen Unterschiede festgestellt werden. Am häufigsten wirkten sie auf Granulozyten vom Menschen (52 % der Staphylokokkenkulturen vom Menschen, 54 % der Rinder- und 52 % der Hundestaphylokokkenkulturen). Weniger häufig war die lytische Wirkung auf Rindergranulozyten (durch 24 % der Menschen-, 27 % der Rinder- und 22 % der Hundestaphylokokkenkulturen). An Hundegranulozyten wurde die Lyse am seltensten beobachtet, nämlich durch 8 % der Kulturen vom Menschen, 14 % der Kulturen vom Rind und 22 % der Kulturen vom Hund. Die beobachtete Lyse der Rinder- und Hundegranulozyten konnte ausnahmslos mit der Wirkung von Leukolysin in Zusammenhang gebracht werden, denn die Kulturen mit lytischer Wirkung waren zugleich leukolysin-positiv, verursachten also Lyse an Granulozyten vom Menschen.

Tabelle 12

Vergleich der leukoziden Wirkungen von S. aureus-Kulturen vom Menschen, Rind und Hund auf Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund

Herkunft der Kulturen	Zahl der untersuchten Kulturen	Art der Zell-schädigung	Zahl der Kulturen mit leukozider Wirkung, Herkunft der Granulozyten		
			Mensch	Rind	Hund
Mensch	50	typisch	17 = 34 %	-	-
		Lyse	26 = 52 %	12 = 24 %	4 = 8 %
Rind	100	typisch	22 = 22 %	-	-
		Lyse	54 = 54 %	27 = 27 %	14 = 14 %
Hund	50	typisch	19 = 38 %	-	27 = 54 %
		Lyse	26 = 52 %	11 = 22 %	11 = 22 %

Tabelle 13

MLeD⁺ einiger S. aureus-Kulturen vom Menschen mit Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund

Kulturen	Art der Zell-schädigung	Granulozyten		
		Mensch MLeD	Rind MLeD	Hund MLeD
V ₈	typisch	512	-	-
	Lyse	-	-	-
Wood	typisch	64	-	-
	Lyse	4	8	-
SAB	typisch	8	-	-
	Lyse	2	2	-
M ₄	typisch	1024	-	-
	Lyse	16	8	4
M ₉	typisch	128	-	-
	Lyse	2	-	-
365	typisch	8	-	-
	Lyse	-	-	-

+ Minimale Leukozyde Dosis

Tabelle 14

MLeD⁺ einiger S. aureus-Kulturen vom R i n d mit Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund

Kulturen	Art der Zell-schädigung	Granulozyten		
		Mensch MLeD	Rind MLeD	Hund MLeD
R ₁₆	typisch	16	-	-
	Lyse	4	8	4
R ₁₇	typisch	32	-	-
	Lyse	4	16	16
R ₂₀	typisch	64	-	-
	Lyse	8	8	4
R ₂₂	typisch	256	-	-
	Lyse	16	16	8
R ₄₇	typisch	-	-	-
	Lyse	4	2	2
R ₅₂	typisch	-	-	-
	Lyse	4	4	2

+ Minimale Leukozyde Dosis

Tabelle 15

MLeD⁺ einiger S. aureus-Kulturen vom H u n d mit Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund

Kulturen	Art der Zell-schädigung	Granulozyten		
		Mensch MLeD	Rind MLeD	Hund MLeD
H ₁	typisch	8	-	64
	Lyse	4	-	2
H ₄₁	typisch	2	-	64
	Lyse	4	-	-
H ₄₂	typisch	4	-	32
	Lyse	2	-	2
H ₄₃	typisch	8	-	32
	Lyse	4	-	2
H ₄₈	typisch	16	-	32
	Lyse	4	-	2
H ₄₉	typisch	16	-	32
	Lyse	2	-	-

+ Minimale Leukozyde Dosis

4,6 Hämolysinbildung bei leukozidin-positiven Staphylokokken

Alle leukozidin-positiven S. aureus-Kulturen vom Menschen, Rind und Hund wurden auf α -, β - und δ -Hämolysin untersucht.

Die Hämolyseaktivität im flüssigen Medium wurde in denselben Kulturüberständen gemessen, die zum Nachweis der leukoziden Substanzen hergestellt worden waren (wie bei 4,4). Darüber hinaus erfolgte die Hämolysinbestimmung auf festem Medium (Blutagarplatten).

Alle NW-leukozidin-positiven Kulturen vom Menschen, Rind und Hund waren zugleich α -hämolytisch, und alle leukolysin-positiven Kulturen waren δ -hämolytisch. Das galt für den Hämolysinnachweis in flüssigem und auf festem Medium (Abb. 12 und 13, 14 und 15).

Zwischen PV-Leukozidin und α -Hämolysin konnte insofern eine Beziehung gefunden werden, als alle PV-leukozidin-positiven Kulturen auf festem Medium zugleich α -Hämolysin produzierten. In der Bouillonkultur bildeten von den PV-leukozidin-positiven Staphylokokken 76 % der Kulturen vom Menschen, 95 % der vom Rind und 37 % der vom Hund α -Hämolysin.

Weitere Parallelen von leukozider und hämolytischer Aktivität konnten nicht gefunden

werden (Abb. 10 - 15). Auffallend war lediglich das geringe Vorkommen von β -Hämolysin bei allen Kulturen humaner Herkunft: Sechs % der PV-leukozidin-positiven Kulturen waren auf der Blutplatte und keine in der Bouillonkultur β -hämolytisch. Von den NW-leukozidin-positiven Kulturen bildeten 33 % auf festem und 27 % in flüssigem Medium β -Hämolysin. Die Stämme caniner und besonders boviner Herkunft waren dagegen häufig β -hämolytisch. Einundachtzig % der PV-leukozidin-positiven Kulturen vom Rind und 74 % der vom Hund zeigten in der Bouillonkultur β -hämolytische Aktivität. Etwas höher lag sie beim Nachweis auf der Blutplatte (86 % der Kulturen vom Rind, 84 % der Kulturen vom Hund). Auch bei NW-leukozidin-positiven und leukolysin-positiven Kulturen vom Rind und Hund war β -Hämolysin häufig zu finden (Abb. 12 - 15). δ -Hämolysin wurde von etwa 70 - 90 % der PV-leukozidin-positiven Kulturen gebildet (Abb. 10 - 11).

Abb. 10

Hämolysinbildung bei PV-leukozidin-positiven Staphylokokkenkulturen auf festem Medium

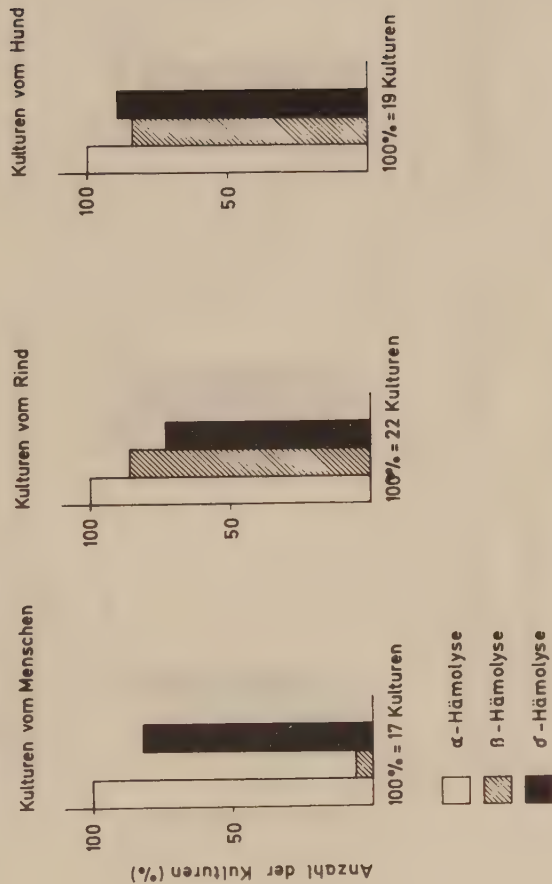


Abb. 11

Hämolysebildung bei PV-Leukozidin-positiven Staphylokokkenkulturen
in flüssigem Medium

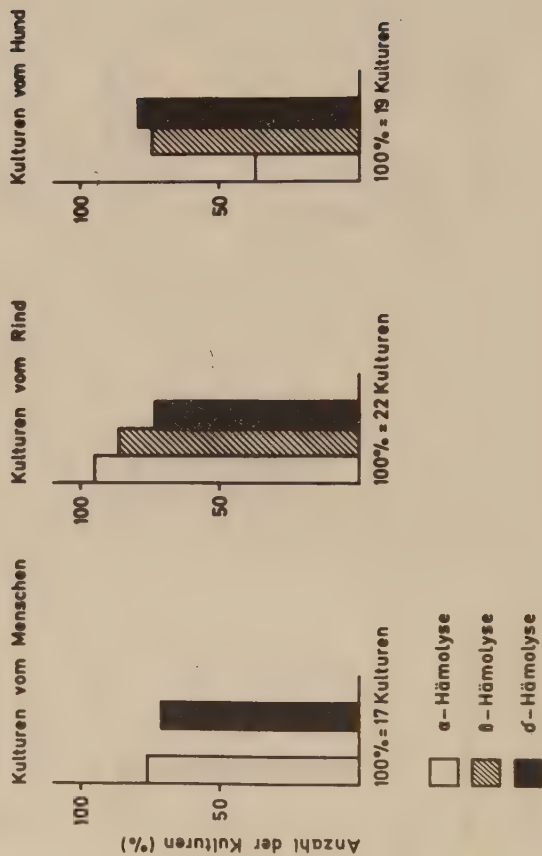


Abb. 12

Hämolyysinbildung bei NW-leukozidin-positiven Staphylokokkenkulturen auf festem Medium

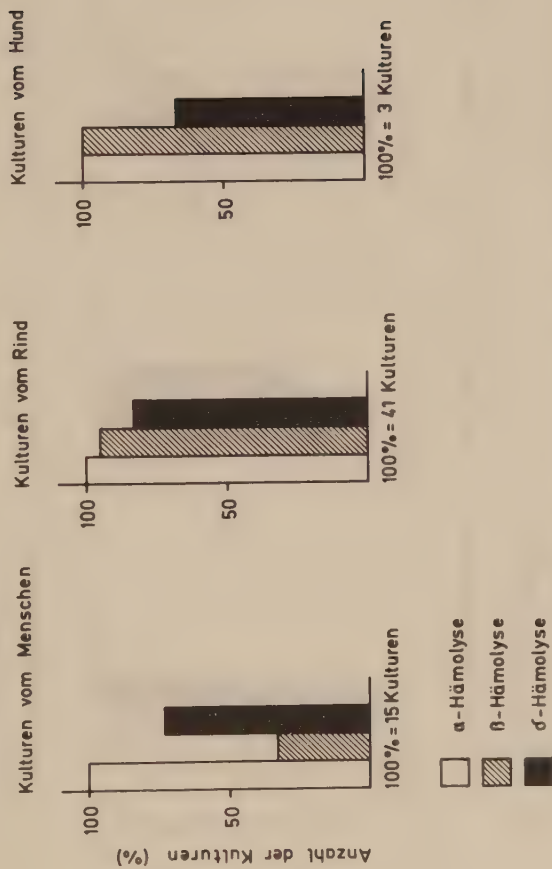


Abb. 13

Hämolysinbildung bei NW-leukozidin-positiven Staphylokokkenkulturen
in flüssigem Medium

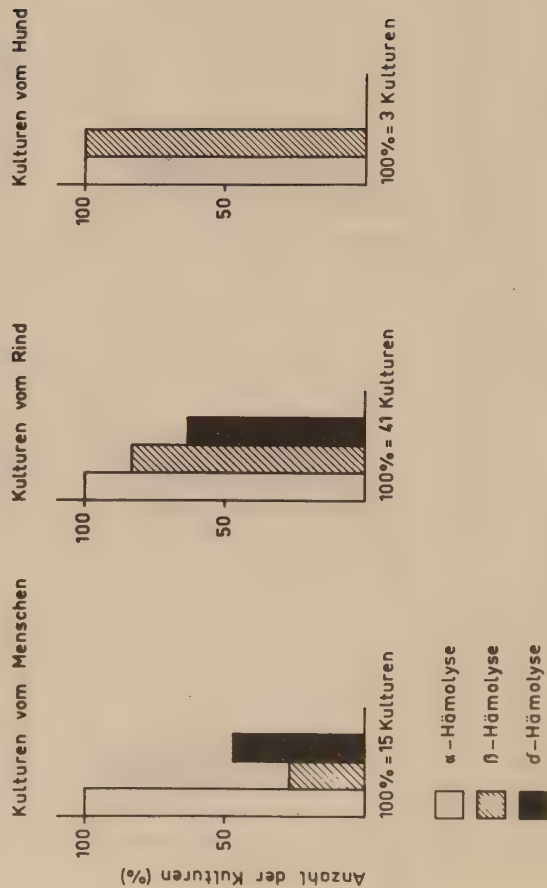


Abb. 14

Hämolyysinbildung bei leukolysin-positiven Staphylokokkenkulturen auf festem Medium

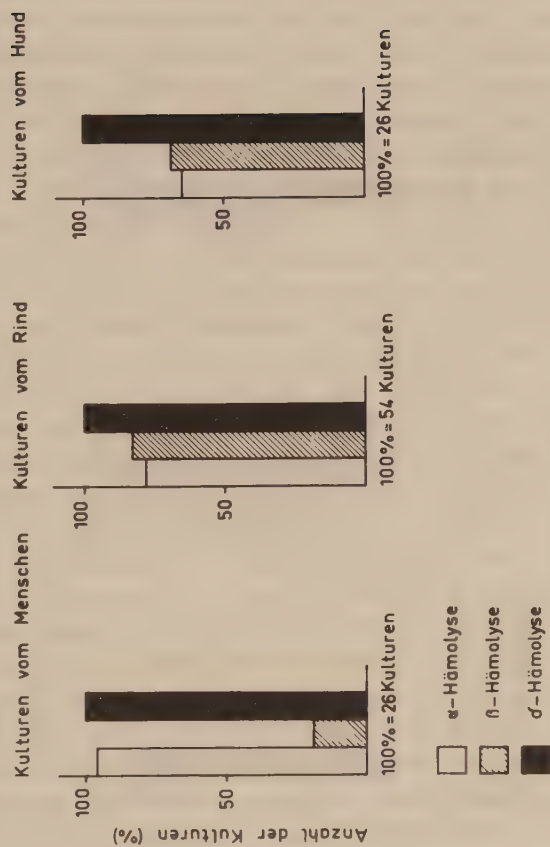
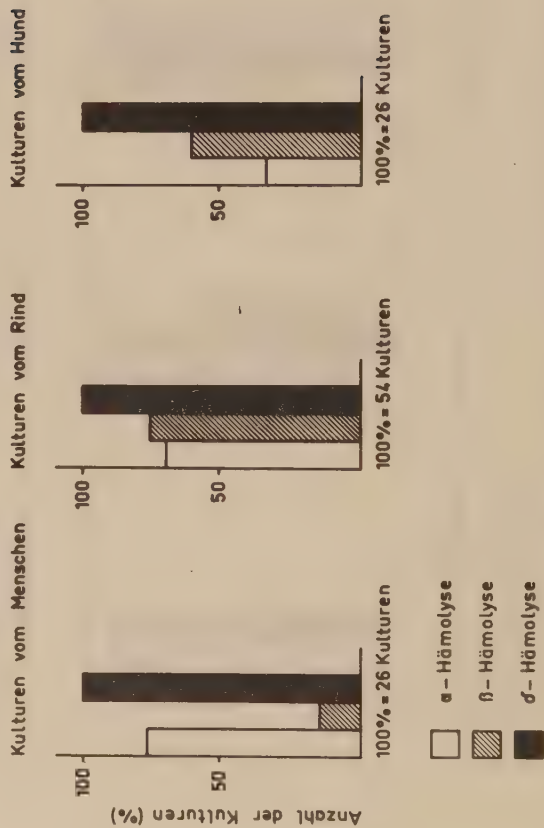


Abb. 15

Hämolysinbildung bei leukolysin - positiven Staphylokokkenkulturen in flüssigem Medium



5,0 Diskussion

Die leukoziden Effekte von Staphylokokken wurden bisher mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Eine Standardmethode war nicht bekannt und eine Standardleukozidineinheit noch nicht definiert. Es war daher zur Durchführung dieser Arbeit notwendig, die aus der Literatur bekannten Methoden zum Nachweis der leukoziden Effekte auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen oder nach neuen Möglichkeiten des Nachweises zu suchen.

Die Prüfung der bekannten Methoden konnte alle Techniken des Leukozidinnachweises auf 2 Prinzipien zurückführen: Die direkte mikroskopische Beobachtung der leukozidingeschädigten Zellen und den indirekten Nachweis der Zellschädigung mit Hilfe eines Farbindikators. Aus dieser Unterscheidung ging bereits hervor, daß Methoden, die den leukoziden Effekt direkt im mikroskopischen Bild zeigten, den Vorzug größerer Sicherheit bei der Beurteilung eines Testergebnisses besaßen, denn die unterschiedlichen Effekte der 3 verschiedenen leukoziden Substanzen waren nur mikroskopisch zu differenzieren. Bei den indirekten Methoden ließ sich lediglich allgemein die Schädigung von Testzellen nachweisen, gleichgültig welcher Art diese Schädigung war. Die Anwendung der indirekten Methode war überhaupt nur erfolgreich, wenn von vornherein sicher war, um welche Art des leukoziden Effektes es sich bei einem Test handelte. Außerdem erforderte die Herstellung einer Testzellsuspension für die indirekte Methode erheblich größere Mengen Granulozyten

als die direkte Methode, bei der verhältnismäßig weniger Zellen (im Extremfall eine Zelle) genügen. Die Herstellung solcher Granulozytenmengen stieß auf methodische Schwierigkeiten, die bei der direkten Methode dank der Haftfähigkeit von Granulozyten an Glasoberflächen nicht existierten. Wegen dieser Schwierigkeiten war die indirekte Methode bisher nur mit Leukozyten oder Makrophagen vom Meerschweinchen und Kaninchen durchgeführt worden, weil bei diesen Tieren auf relativ einfache Weise Leukozyten (Makrophagen) aus dem Peritonealexsudat gewonnen werden konnten. Mit der in dieser Arbeit angewandten Technik der Isolierung von Granulozyten aus dem Blut durch Abzentrifugieren und anschließender Objektträgeradhäsion war es möglich geworden, die Granulozyten aller untersuchten Tierarten - sofern sie an Glasoberflächen haften blieben - unter gleichen Bedingungen auf leukozide Effekte zu untersuchen.

Trotz der Vorzüge der direkten gegenüber der indirekten Methode, auf die zum Teil VALENTINE³⁷, GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ und BÄNFFER² bereits hingewiesen haben, war der Leukozidinnachweis mit beiden Methoden umständlich und zeitaufwendig. Insbesondere stellte die Kurzlebigkeit der isolierten Granulozyten den Untersucher vor die Notwendigkeit, zu jedem Leukozidintest frische Granulozyten zu präparieren. Diese Tatsache begrenzte den Umfang aller Leukozidinnachweise und damit die Leukozidinforschung überhaupt. Deshalb wurde auch in dieser Arbeit der Versuch unternommen, die Granulozyten durch andere Zellen zu ersetzen, die

leichter zu präparieren oder über längere Zeit haltbar waren. Zu diesem Zweck schienen Amöben mit ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und amöboiden Beweglichkeit geeignet. Die Myxamöben phagozytierten nach GERISCH¹¹ Bakterien schneller, wenn diese mit Antikörpern beladen waren. So zeigte GERISCH¹¹, daß Dictyostelium discoideum die Bakterien von Salmonella milwaukee (S-Form) nur phagozytierten, wenn diese vorher mit Anti-Salmonella-milwaukee-Serum opsonisiert waren. Wenn Dictyostelium discoideum in den hier vorgelegten Untersuchungen auch unempfindlich gegenüber den leukoziden Substanzen aller drei Typen war, schließt das nicht aus, daß bei verschiedenen Amöbenarten ähnlich den Granulozyten verschiedener Tierarten eine unterschiedliche Empfindlichkeit für leukozide Substanzen besteht. Es wäre vielleicht weiter zu prüfen, ob andere Amöben durch leukozide Substanzen geschädigt werden können.

Aus den Untersuchungen WOODINS⁴⁰ über die PV-Leukozidinproduktion ging hervor, daß es nicht unerheblich war, welches Medium zur Kultivierung von Staphylokokken verwendet wurde, um hohe PV-Leukozidinkonzentrationen zu erzielen. Über die geeignetste Inkubationsdauer lagen sehr unterschiedliche Angaben vor. Darum wurden zu Beginn dieser Untersuchungen einige Kulturmedien auf maximale Leukozidinbildung geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß Hefesubstanzen enthaltende Medien am besten waren. Dieser Befund stimmte mit den Beobachtungen von GLADSTONE und VAN HEYNIN-

GEN¹³ überein. Auch konnte die Bedeutung einer richtigen Wahl der Konzentration von Hefesubstanzen und der Art des verwendeten Hefeextraktes in solchen Medien in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von WOODIN⁴⁰ bestätigt werden. Demzufolge wurde durch bessere Einstellung der Konzentration des Hefeextraktes in dem "L-Medium" nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ ein modifiziertes L-Medium ("L-O₃") entwickelt, das gegenüber dem Originalmedium höhere PV-Leukozidinkonzentrationen ergab. Die maximalen MLeD wurden in diesem Medium mit 4 Staphylokokkenstämmen nach einer Inkubationsdauer von 15 - 20 Std. erzielt.

Bei den Untersuchungen über die Häufigkeit der Leukozidinbildung bei Staphylokokken verschiedener Herkunft interessierten besonders die Staphylokokkenkulturen von Tieren, da bisher kaum Angaben über das Vorkommen leukozider Substanzen bei "tierischen" Staphylokokken vorlagen. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß alle 3 leukoziden Substanzen ebenfalls von Staphylokokken vom Rind und Hund gebildet werden. Die veterinärmedizinisch am meisten interessierenden "bovinen" Staphylokokken hatten den niedrigsten prozentualen Anteil (22 %) PV-leukozidin-positiver Kulturen. Dagegen kam bei ihnen am häufigsten das Leukolysin vor (54 %). Umgekehrt war bei caninen Kulturen am häufigsten PV-Leukozidin (38 %) und weniger häufig Leukolysin zu finden. Es fiel auf, daß Kulturen vom Menschen

häufiger hohe PV-Leukozidinkonzentrationen ergaben als die von Tieren. Die Frage, ob den Kulturen mit hoher MLeD eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Pathogenität bei Staphylokokkeninfektionen zukommt, konnte aufgrund dieser Ergebnisse nicht beantwortet werden. Ebenso konnte aus dem selteneren Vorkommen von PV-Leukozidin bei Staphylokokkenkulturen vom Rind nicht abgeleitet werden, daß bei der veterinärmedizinisch so bedeutsamen Staphylokokkenmastitis der Rinder dem PV-Leukozidin weniger pathogene Bedeutung zukommt als bei der Staphylokokkenmastitis des Menschen. Auf den Zusammenhang zwischen der Immunität von Frauen gegen Staphylokokkenmastitis und Anti-PV-Leukozidintitern im Serum solcher Patienten hatte JOHANOWSKY²⁰ hingewiesen. Das seltenere Vorkommen von PV-Leukozidin bei den untersuchten Rinderstaphylokokken könnte durchaus dadurch bedingt gewesen sein, daß sie von Kaninenmilchproben und nicht direkt von Kühen mit akuten Mastitiden isoliert worden waren.

Im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren war das PV-Leukozidinvorkommen bei Staphylokokken vom Menschen mit 34 % in diesen Untersuchungen verhältnismäßig gering. Nur IMPERATO et al.¹⁶ fanden etwa den gleichen Prozentanteil (37 %). Sehr hohe Prozentzahlen waren bei PANTON und VALENTINE³⁰ (77 %) und bei JOHANOWSKY²⁰ zu finden. Jedoch war bei den Experimenten dieser Autoren die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß in ihre Angaben die leukolysinpositiven Fälle einbezogen wurden, weil ihnen

die eigentliche Existenz des häufig vorkommenden Leukolysins noch nicht bekannt war. So konnten sie Leukozidin noch nicht von Leukolysin differenzieren. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ unterschieden bereits zwischen PV-Leukozidin und Leukolysin und berichteten, daß 48 % der Kulturen vom Menschen PV-leukozidin-positiv waren.

Die ermittelten Prozentzahlen für das Vorkommen von NW-Leukozidin waren, wie schon erwähnt, nicht verwertbar, weil der Nachweis von NW-Leukozidin in Gegenwart von PV-Leukozidin schwierig oder unmöglich war. Die morphologischen Veränderungen der Testzellen durch PV-Leukozidin waren stärker ausgeprägt, so daß der Effekt durch NW-Leukozidin bei Anwesenheit von PV-Leukozidin nicht erkennbar war. Nur wenn in einem Toxin die NW-Leukozidinkonzentration erheblich größer war als die PV-Leukozidinkonzentration, konnte in Verdünnungsreihen das NW-Leukozidin nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Angaben von IMPERATO et al.¹⁶, aber in Übereinstimmung mit denen einer Reihe anderer Autoren, standen die Befunde bei koagulase-negativen Staphylokokken. PV-Leukozidin war bei ihnen nicht zu finden, wohl aber NW-Leukozidin und Leukolysin.

Durch die MLeD-Bestimmungen von S. aureus-Kulturen vom Menschen, Rind und Hund mit den Granulozyten vom Menschen, Rind und Hund sollte festgestellt werden, ob Staphylokokken auf Gra-

nulozyten der Spezies, von der sie isoliert worden waren, eine stärkere leukozide Wirksamkeit ausübten als auf die Granulozyten der anderen Tierarten. Diese Frage blieb offen, wenngleich auch Hinweise für eine spezifische Wirkung leukozider Substanzen von Hundestaphylokokken auf Hundegranulozyten erhalten wurden. Der Befund, daß PV-Leukozidin von Hundestaphylokokken am stärksten auf Hundegranulozyten wirksam war, könnte in diesem Sinne gedeutet werden.

Rindergranulozyten erwiesen sich als verhältnismäßig unempfindlich gegenüber PV-Leukozidin. Sie zeigten auch keine für PV-Leukozidin charakteristischen Veränderungen gegenüber Kulturüberständen einer Reihe von Staphylokokkenkulturen vom Rind. Der einzige an Rindergranulozyten zu beobachtende Effekt war Lyse. Er war durch Leukolysin verursacht. Es lag daher nahe, die Bedeutung von PV-Leukozidin für Staphylokokkeninfektionen des Rindes in Frage zu stellen. Außerdem bildeten Staphylokokkenkulturen vom Rind nur selten PV-Leukozidin. Man muß jedoch auf die Möglichkeit verweisen, daß der Wirkungsmechanismus leukozider Substanzen im Pathogenitätsgeschehen von Staphylokokkeninfektionen sich nicht unbedingt in der morphologischen Schädigung der Granulozyten manifestieren muß.

Eine größere Bedeutung für die Pathogenität von Rinderstaphylokokkenkulturen scheint nach diesen Untersuchungen das Leukolysin zu besitzen. Es war die einzige leukozide Substanz, die Granulo-

zyten vom Rind sichtbar schädigte. Zudem kam es relativ häufig, nämlich bei 54 % der untersuchten 100 Staphylokokkenkulturen vom Rind vor. Auch bei dieser leukoziden Substanz wären eingehendere Untersuchungen nötig, die mögliche Zusammenhänge mit der Virulenz der Staphylokokken klären müßten.

Bei der Hämolysinbildung leukozidin-positiver Staphylokokken interessierten besonders das α - und δ -Hämolysin, weil das erstere mit NW-Leukozidin und das letztere mit Leukolysin identisch sein sollten. Die Annahme dieser beiden Identitäten konnte bestätigt werden. Auch die von vielen Autoren berichtete Parallelität zwischen PV-Leukozidin und α -Hämolysinbildung konnte ebenfalls beobachtet werden: Alle PV-leukozidin-positiven Kulturen waren auch α -hämolytisch. Das heißt aber nicht, daß beide Substanzen identisch waren, denn bei einer großen Zahl von α -hämolytischen Kulturen konnte kein PV-Leukozidin nachgewiesen werden.

6,0 Zusammenfassung

Von 4 bekannten Methoden zum Nachweis der leukoziden Effekte bei Staphylokokken wurde die direkte mikroskopische Methode nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹³ am geeignetsten gefunden. Diese Methode wurde weiterhin durch Verwendung abzentrifugierter Leukozytensuspensionen anstelle von Gesamtblut verbessert. Die modifizierte Methode ermöglichte, daß Granulozyten von allen untersuchten Tierarten isoliert und zum Nachweis leukozider Effekte verwendet werden konnten.

Von den Granulozyten verschiedener Tierarten erwiesen sich die vom Kaninchen am empfindlichsten für alle 3 leukoziden Substanzen. Zum Nachweis von PANTON-VALENTINE(PV)-Leukozidin und Leukolysin eigneten sich jedoch Granulozyten vom Menschen am besten.

Myxamöben (Dictyostelium discoideum) zeigten keine morphologischen Veränderungen mit NEISSER-WECHSBERG(NW)-Leukozidin, PV-Leukozidin und Leukolysin. Sie waren nicht geeignet, die Granulozyten in der Nachweismethode für Leukozidin zu ersetzen.

Von 100 koagulase-positiven Staphylokokkenkulturen vom Rind bildeten 22 % PV-Leukozidin und 54 % Leukolysin. Von 50 solcher Kulturen vom Hund bildeten 38 % PV-Leukozidin und 52 % Leukolysin. Von 50 Kulturen vom Menschen bildeten 34 % PV-Leukozidin und 52 % Leukolysin.

Koagulase-negative Staphylokokkenkulturen verschiedener Herkunft bildeten niemals PV-Leukozidin, jedoch NW-Leukozidin und Leukolysin.

Hundestaphylokokken bildeten ein PV-Leukozidin, welches an Granulozyten vom Hund häufiger wirksam war als an denen vom Menschen. Dagegen war das PV-Leukozidin der Staphylokokken vom Menschen und vom Rind nur an Granulozyten vom Menschen wirksam.

PV-Leukozidin wurde nur von α -hämolytischen Staphylokokken gebildet.

Alle NW-leukozidin-positiven Staphylokokkenkulturen waren zugleich α -hämolytisch und alle leukolysin-positiven Kulturen zugleich δ -hämolytisch.

7,0 Literaturverzeichnis

1. BAIL, O. : Über leukozide Substanzen in
den Stoffwechselprodukten
des Staphylococcus pyogenes
aureus.
Arch. Hyg. 32, 133 - 171 (1898)
2. BÄNFFER, J.R.J. : Antileucocidine bij staphylo-
kokkeninfecties.
Proefschrift Utrecht (1962)
3. BÄNFFER, J.R.J. : Anti-leucocidin and mastitis
puerperalis.
Brit. med. J. 62, 1224 - 1226
(1962)
4. BÄNFFER, J.R.J. : Immunization with leucocidin
FRANKEN, J.F. toxoid against staphylococcal
infection.
Path. et Microbiol. 30, 166 -
174 (1967)
5. BEHRENS, M. : Gewinnung von Leukozyten aus
ESCH, F. Rinderblut unter Verwendung
von Wasser als Hämolytikum.
Experientia 19, 406 - 407 (1963)
6. BERNHEIMER, A.W. : Lytic effects of staphylo-
AVIGAD, L.S. coccal α -toxin and δ -haemo-
GRUSHOFF, Ph. lysin.
J. Bact. 96, 487 - 491 (1968)

7. BERNHEIMER, A.W. : Lysosomal disruption by
SCHWARTZ, L.L. bacterial toxins.
J. Bact. 87, 1100 - 1104
(1964)
8. DENYS, J. : Sur la production d'une
VAN DE VELDE, H. antileucocidine chez les
lapins vaccinés contre le
staphylocoque pyogène.
Cellule 11, 359 - 372 (1895)
9. ELEK, St.D. : Distribution of haemolysins
LEVY, E. in pathogenic and non-
pathogenic staphylococci.
J. Path. Bact. 62, 541 - 554
(1950)
10. GERISCH, G. : Zellfunktionen und Zell-
funktionswechsel in der Ent-
wicklung von Dictyostelium
discoideum.
Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-
Mech. Org. 152, 632 - 654
(1960)
11. GERISCH, G. : Antikörper fördern die Phago-
LÜDERITZ, O. zytose von Bakterien durch
RUSCHMANN, E. Amöben.
Z. Naturforsch. 22 b, 109
(1967)

12. GLADSTONE, G.P. : Staphylococcal haemolysins.
Postepy Mikrobiologii t. V,
z. 2, 145 - 161 (1966)
13. GLADSTONE, G.P. : Staphylococcal leucocidins.
VAN HEYNINGEN, W.E. Brit. J. exp. Path. 38, 123 -
137 (1957)
14. GLADSTONE, G.P. : The cytopathic action of
YOSHIDA, A. purified staphylococcal
 δ -haemolysin.
Brit. J. exp. Path. 48, 11 -
19 (1967)
15. GROSS, H. : Die Fermente und Giftstoffe
der Staphylokokken.
Ergebn. Hyg. Bakt. 13, 516 -
558 (1932)
16. IMPERATO, S. : Del valore di alcune prove
ARMINI, G. per l'identificazione degli
BERTINI, V. stafilococchi patogeni.
Boll. Ist. sieroter. milan.
45, 9 - 10 (1966)
17. JACKSON, A.W. : The delta-toxin of Micro-
LITTLE, R.M. coccus pyogenes var. aureus.
Bact. Proc. 9, 88 (1956)
18. JELJASZEWICZ, J. : Platelet aggregation by
NIEWIAROWSKI, S. staphylococcal toxins.
POPLAWSKI, A. Postepy Mikrobiologii t. V, z.
2, 203 - 206 (1966)

19. JENSEN, T. : A study of the action of
MALOE, O. staphylococcus toxin on
leucocytes.
Acta path. microbiol. scand.
27, 313 - 324 (1950)
20. JOHANOWSKY, J. : The significance of staphylo-
coccal α -toxin and leucocidin.
Folia biol. (Praha) 3, 10 -
16 (1957)
21. JULIANELLE, L.A. : Studies of haemolytic staphylo-
cocci.
J. Infect. Dis. 31, 256 - 284
(1922)
22. KORBECKI, M. : Action of staphylococcal
JELJASZEWICZ, J. toxins in cell cultures.
J. Infect. Dis. 115, 205 - 213
(1965)
23. KUMAR, S. : The characterization of staphylo-
LINDORFER, R.K. coccal toxins.
J. exp. Med. 115, 1095 - 1115
(1962)
24. VON LINGELSHEIM, W. : Ätiologie und Therapie der
Staphylokokkeninfektionen.
In "E.v.Behring: Beiträge zur
experimentellen Therapie".
Urban und Schwarzenberg, Berlin
und Wien (1900)

25. MAASSEN, W. : Zur Biologie und Resistenz
WULKOW, R. pathogener Staphylokokken
unter besonderer Berücksich-
tigung der hämolysierenden
Toxine bei verschiedenen Er-
krankungen.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.
208, 161 - 169 (1968)
26. MEYER, W. : Über die Brauchbarkeit des
Koagulasetestes mit verschie-
denen Plasmaarten zur Dif-
ferenzierung von Staphylo-
coccus aureus - Stämmen.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.
209, 465 - 481 (1966)
27. NEISSER, M. : Über das Staphylotoxin.
WECHSBERG, F. Z. Hyg. Inf.-Kr. 36, 299 -
349 (1901)
28. OGURTSOV, R.P. : The effect of staphylococcal
toxins on blood cells and
tissue cultures.
Bjul. Eksp. Biol. Med. 64(12),
34 - 35 (1967)
29. PANTON, P.N. : Staphylococcal infection and
VALENTINE, F.C.O. antitoxin treatment.
DIX, V.W. Lancet 221, 1180 - 1183 (1931)
30. PANTON, P.N. : Staphylococcal toxin.
VALENTINE, F.C.O. Lancet 222, 506 - 508 (1932)

31. PARKER, R.C. : Methods of tissue culture.
Harper & Row, New York (1964)
32. PARKER, T. : Differentiation between
WELD, J.T. certain toxic properties of
GUNTHER, A. filtrates of hemolytic
Staphylococcus aureus.
J. exp. Med. 54, 315 - 322
(1931)
33. PROOM, H. : The interrelationships of
staphylococcal leucocidins.
J. Path. Bact. 44, 425 - 429
(1937)
34. SOUCKOVA- : The immunization of rabbits
STEPANOVA, J. with staphylococcal leucocidin
GLADSTONE, G.P. toxoid.
Brit. J. exp. Path. 46, 384 -
407 (1965)
35. SVETOVIDOVA, V.M. : Leucocidin from staphylococci -
LOBANOVA, M.P. the causative agents of in-
fections of wounds.
Zh. Mikrobiol. (Mosk.) 42(8),
53 - 58 (1965)
36. TAMAKI, S. : Experimentelle Studien über
das Staphylosin und Leukozi-
din von pathogenen Staphylo-
kokken.
Fukuoka Ikwadaigaku Zasshi
21, 14. - 16 (1928)

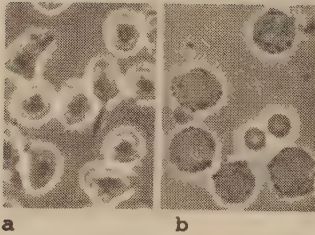
37. VALENTINE, F.C.O. : Further observations on the
role of the toxin in staphylo-
coccal infection.
Lancet 230, 526 - 531 (1936)
38. VALENTINE, F.C.O. : Specific immunity in acute
BUTLER, E.C.B. staphylococcal osteomyelitis.
Lancet 234, 973 - 977 (1939)
39. VAN DE VELDE, H. : Etude sur le mécanisme de la
virulence du staphylocoque
pyogène.
Cellule 10, 401 - 410 (1894)
40. WOODIN, A.M. : Fractionation of a leucocidin
from Staphylococcus aureus.
Biochem. J. 73, 225 - 237
(1959)
41. WOODIN, A.M. : Purification of the two
components of leucocidin
from Staphylococcus aureus.
Biochem. J. 75, 158 - 165 (1960)
42. WOODIN, A.M. : The effect of staphylococcal
leucocidin on the leucocyte.
Biochem. J. 80, 562 - 572
(1961)
43. WOODIN, A.M. : Assay of the two components
of staphylococcal leucocidin
and their antibodies.
J. Path. Bact. 81, 63 - 68
(1961)

44. WOODIN, A.M. : The extrusion of protein
from the rabbit polymorpho-
nuclear leucocyte treated
with staphylococcal leuco-
cidin.
Biochem. J. 82, 9 - 15 (1962)
45. WOODIN, A.M. : The participation of calcium,
WIENEKE, A.A. adenosine triphosphate and
adenosine triphosphatase in
the extrusion of the granule
proteins from the polymorpho-
nuclear leucocyte.
Biochem. J. 90, 498 - 509
(1964)
46. WOODIN, A.M. : The cytotoxic effect of leuco-
WIENEKE, A.A. cidin.
Ciba Foundation Symposium on
Cellular Injury, 30 - 52,
London (1964)
47. WOODIN, A.M. : Staphylococcal leucocidin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 128(1),
152 - 164 (1965)
48. WOODIN, A.M. : Staphylococcal leucocidin.
Postepy Mikrobiologii t. V,
z. 2, 163 - 169 (1966)
49. WRIGHT, J. : Staphylococcal leucocidin
and anti-leucocidin.
Lancet 230, 1002 - 1004
(1936)

50. YOSHIDA, A. : Staphylococcal δ -haemolysin.
Biochim. biophys. Acta 71,
544 - 553 (1963)

Anhang

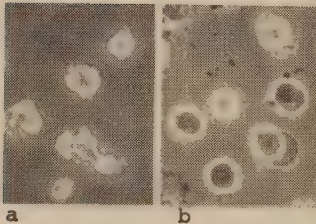
Abb. 1, a : Lebende Granulozyten
vom Menschen



b : PV-Leukozidin-
geschädigte Granulo-
zyten vom Menschen

Abb. 1

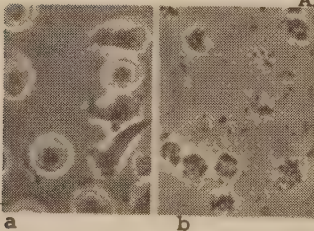
Abb. 2, a : Lebende Granulozyten
vom Kaninchen



b : NW-Leukozidin-
geschädigte Granulo-
zyten vom Kaninchen

Abb. 2

Abb. 3, a : Lebende Granulozyten
vom Menschen



b : Leukolysin-
geschädigte Granulo-
zyten vom Menschen

Abb. 3

Abbildungen 1 - 3 sind phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen bei 320-facher Vergrößerung (Objektiv: Neofluar⁽¹⁾ 40 / 0,75, Belichtungszeit: 1/60 Sek.)

(1) Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

Nach Abschluß der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Blobel für die Themastellung und die jederzeit gewährte Unterstützung sehr herzlich bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. G. P. Gladstone, Oxford, England, für die Überlassung des Staphylokokkenstammes V₈ und Herrn Dr. A. M. Woodin, Oxford, England, für seine Auskünfte über die Gewinnung von Kanimchenmakrophagen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Tolle und Herrn Dr. Heeschen, Institut für Milchhygiene, Kiel, sowie Herrn Regierungsveterinär Dr. Kielwein, Tierärztliches Untersuchungsamt, Aulendorf, für die Zusendung von Untersuchungsmaterial. Auch den anderen Instituten und Untersuchungsämtern sei für die Einsendung von Staphylokokkenkulturen gedankt.

Herrn Dr. Gerisch, Freiburg, danke ich für die Zusendung der Myxamöben.

Herrn Prof. Dr. Dengler, Medizinische Kliniken und Polikliniken an der Justus Liebig-Universität Gießen und Herrn Prof. Dr. Dehner, Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik und Medizinische Poliklinik an der Justus Liebig-Universität Gießen, danke ich dafür, daß sie es mir ermöglicht haben, Blut zur Granulozytengewinnung von ihren Patienten zu erhalten.

Allen meinen Mitarbeitern, die sich zur Blutentnahme bereitstellten, danke ich herzlich.

Lebenslauf

- 1938 30. Mai geboren in Ebenrode/Ostpr..
- 1944 - 49 Volksschule in Trakehnen, Bautzen, Mahlum und Remlingen.
- 1949 - 55 Mittelschule in Wolfenbüttel.
- 1955 - 58 Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Wolfenbüttel.
- 1958 4. März Reifeprüfung.
- 1958 Halbjähriges Praktikum im Hochbau zur Zulassung zum Studium der Architektur.
- 1958 - 59 Studium der Architektur an der Technischen Hochschule Braunschweig.
- 1959 - 61 Studium der Zoologie, Botanik, Chemie und Geographie an der Technischen Hochschule Braunschweig.
- 1961 - 66 Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen.
- 1963 17. April Tierärztliche Vorprüfung.
- 1966 9. September Tierärztliche Prüfung.
- 1966 - 67 Veterinärpraktikantenzeit bei Dr. Friedrich-Wilhelm Boßler in Grünberg/Hessen.
- 1967 17. April Tierärztliche Approbation.
- 1967 - 69 Anfertigung dieser Dissertation am Institut für Bakteriologie und Immunologie an der Justus Liebig-Universität Gießen unter Leitung des Direktors Prof. Dr. H. Blobel.
- Seit 1967 Mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Institut für Bakteriologie und Immunologie der Justus Liebig-Universität beauftragt.

INHALT

1. Die Natur der Dinge...
2. Die Natur der Dinge...
3. Die Natur der Dinge...
4. Die Natur der Dinge...
5. Die Natur der Dinge...
6. Die Natur der Dinge...
7. Die Natur der Dinge...
8. Die Natur der Dinge...
9. Die Natur der Dinge...
10. Die Natur der Dinge...
11. Die Natur der Dinge...
12. Die Natur der Dinge...
13. Die Natur der Dinge...
14. Die Natur der Dinge...
15. Die Natur der Dinge...
16. Die Natur der Dinge...
17. Die Natur der Dinge...
18. Die Natur der Dinge...
19. Die Natur der Dinge...
20. Die Natur der Dinge...
21. Die Natur der Dinge...
22. Die Natur der Dinge...
23. Die Natur der Dinge...
24. Die Natur der Dinge...
25. Die Natur der Dinge...
26. Die Natur der Dinge...
27. Die Natur der Dinge...
28. Die Natur der Dinge...
29. Die Natur der Dinge...
30. Die Natur der Dinge...
31. Die Natur der Dinge...
32. Die Natur der Dinge...
33. Die Natur der Dinge...
34. Die Natur der Dinge...
35. Die Natur der Dinge...
36. Die Natur der Dinge...
37. Die Natur der Dinge...
38. Die Natur der Dinge...
39. Die Natur der Dinge...
40. Die Natur der Dinge...
41. Die Natur der Dinge...
42. Die Natur der Dinge...
43. Die Natur der Dinge...
44. Die Natur der Dinge...
45. Die Natur der Dinge...
46. Die Natur der Dinge...
47. Die Natur der Dinge...
48. Die Natur der Dinge...
49. Die Natur der Dinge...
50. Die Natur der Dinge...
51. Die Natur der Dinge...
52. Die Natur der Dinge...
53. Die Natur der Dinge...
54. Die Natur der Dinge...
55. Die Natur der Dinge...
56. Die Natur der Dinge...
57. Die Natur der Dinge...
58. Die Natur der Dinge...
59. Die Natur der Dinge...
60. Die Natur der Dinge...
61. Die Natur der Dinge...
62. Die Natur der Dinge...
63. Die Natur der Dinge...
64. Die Natur der Dinge...
65. Die Natur der Dinge...
66. Die Natur der Dinge...
67. Die Natur der Dinge...
68. Die Natur der Dinge...
69. Die Natur der Dinge...
70. Die Natur der Dinge...
71. Die Natur der Dinge...
72. Die Natur der Dinge...
73. Die Natur der Dinge...
74. Die Natur der Dinge...
75. Die Natur der Dinge...
76. Die Natur der Dinge...
77. Die Natur der Dinge...
78. Die Natur der Dinge...
79. Die Natur der Dinge...
80. Die Natur der Dinge...
81. Die Natur der Dinge...
82. Die Natur der Dinge...
83. Die Natur der Dinge...
84. Die Natur der Dinge...
85. Die Natur der Dinge...
86. Die Natur der Dinge...
87. Die Natur der Dinge...
88. Die Natur der Dinge...
89. Die Natur der Dinge...
90. Die Natur der Dinge...
91. Die Natur der Dinge...
92. Die Natur der Dinge...
93. Die Natur der Dinge...
94. Die Natur der Dinge...
95. Die Natur der Dinge...
96. Die Natur der Dinge...
97. Die Natur der Dinge...
98. Die Natur der Dinge...
99. Die Natur der Dinge...
100. Die Natur der Dinge...

